

162

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2001年7月5日 (05.07.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/48188 A1(51)国際特許分類⁷: C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21,
5/10, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68,
A61K 31/711, 48/00, A61P 43/00, G01N 33/15, 33/50

(21)国際出願番号: PCT/JP00/09408

(22)国際出願日: 2000年12月28日 (28.12.2000)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願平11/375152
1999年12月28日 (28.12.1999) JP
特願2000/101339 2000年3月31日 (31.03.2000) JP(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所(HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3
Chiba (JP).(72)発明者: および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 松本俊一郎
(MATSUMOTO, Shun-ichiro) [JP/JP]; 〒273-0005 千葉
県船橋市本町4-43-2-605 Chiba (JP). 小田環(ODA,Tamaki) [JP/JP]; 〒292-0054 千葉県木更津市長須賀
392-203 Chiba (JP). 斎藤洋子(SAITO, Youko) [JP/JP];
〒292-0043 千葉県木更津市東太田4-5-13-103 Chiba
(JP). 森川記行(MORIKAWA, Noriyuki) [JP/JP]; 〒292-
0833 千葉県木更津市貝瀬3-9-17-408 Chiba (JP). 吉田
賢二(YOSHIDA, Kenji) [JP/JP]; 〒292-0043 千葉県木
更津市東太田4-11-1-302 Chiba (JP). 諸訪牧子(SUWA,
Makiko) [JP/JP]; 〒144-0052 東京都大田区蒲田1-24-4
Tokyo (JP). 杉山友康(SUGIYAMA, Tomoyasu) [JP/JP];
〒292-0045 千葉県木更津市清見台2-6-23-102 Chiba
(JP). 岸本利光(KISHIMOTO, Toshimitsu) [JP/JP]. 神
崎廉治(KANZAKI, Kouji) [JP/JP]. 保田慎一郎(YA-
SUDA, Shin-ichiro) [JP/JP]. 井上佳久(INOUE, Yoshi-
hisa) [JP/JP]; 〒573-1153 大阪府枚方市招提大谷2-25-1
ウェルファイド株式会社 創薬研究所内 Osaka (JP).(74)代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki (JP).(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[続葉有]

(54)Title: NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING PROTEIN-COUPLED RECEPTORS, GENES THEREOF AND
PRODUCTION AND USE OF THE SAME(54)発明の名称: 新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製
造および用途(57)Abstract: Nine novel genes sustaining hydrophobic domains, which are seemingly 7 transmembrane domains characteristic
to G protein-coupled receptors, are successfully isolated by human tissue cDNA screening. These genes and proteins which are the
expression products thereof are usable in screening ligands, screening agonists or antagonists which are useful as drugs, diagnosing
diseases in which these gene participate, etc.

(57)要約:

WO 01/48188 A1

ヒト組織cDNAのスクリーニングにより、G蛋白質共役型受容体の特徴である

7個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する9種類の新規遺伝子を
単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンド
のスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリ
ーニング、さらにはこれら遺伝子が関連する疾患の診断などに利用し得る。



(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

- 1 -

明細書

新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、 並びにそれらの製造および用途

技術分野

本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

G 蛋白質共役型受容体(G protein-coupled receptors)は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体群の総称である。G 蛋白質共役型受容体は、分子内に細胞膜貫通領域を 7 回有する構造上の特性から、「7 回膜貫通型受容体」とも呼ばれる。G 蛋白質共役型受容体は様々な生理活性物質の情報を、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型 GTP 結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介する cAMP、フォスフォリバーゼ C を介する Ca^{2+} などがよく知られているが、三量体型 GTP 結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた (Annu. Rev. Neurosci. (97) 20:399)。G 蛋白質共役型受容体に対する基質(リガンド)は、大変多岐に渡っており、タンパク性ホルモン、ケモカイン、ペプチド、アミン、脂質由来物質、さらにはトロンビンの様なプロテアーゼもその一例となる。現在、遺伝子が同定された G 蛋白質共役型受容体の数は感覚器受容体を除くと、ヒトで 300 個弱存在するが、リガンドが同定された G 蛋白質共役型受容体の数は、そのうち約 140 種類に過ぎず、リガン

- 2 -

ド未知な「オーファン G 蛋白質共役型受容体」が 100 種類以上存在している。しかしながら実際のヒトゲノム中には、少なくとも 400 種類、場合によっては 1 000 種類もの G 蛋白質共役型受容体が存在する、とも想定されている (*Trends Pharmacol. Sci.* (97) 18:430)。この事は、今後のゲノム解析の飛躍的進展に伴って、機能未知なオーファン G 蛋白質共役型受容体の数も爆発的に増加する事を意味している。

これまでに世界の製薬企業により創られてきた薬剤は、その 9 割以上が細胞外空間での相互作用を標的としており、その中でも G 蛋白質共役型受容体に関連する低分子薬は大部分を占めている。その根拠としては、G 蛋白質共役型受容体が関連する疾患が、遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系など、非常に多くの領域に関連することにある。そのため、最近では多くの製薬企業がゲノム解析で明らかとなったオーファン G 蛋白質共役型受容体を所有し、リガンド探索と生理機能の解明に鋏を削っている。こうした状況を背景として、最近では新規 G 蛋白質共役型受容体の生理的リガンド探索の成功例も報告され始めている。例えば、calcitonin gene-related peptide 受容体 (*J. Biol. Chem.* (96) 271:11325)、orexin (*Cell* (98) 92:573) そして prolactin-releasing peptide (*Nature* (98) 393:272)などの事例は、生命科学分野での基礎研究としても大きな衝撃を持つ事例であった。

特に、オーファン G 蛋白質共役型受容体は新たな薬剤開発に繋がる可能性の高い標的として、多大な注目を集めている。一般的にオーファン G 蛋白質共役型受容体には特異的なリガンドが存在しないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーとハイスループットスクリーニングと組み合わせることで、オーファン G 蛋白質共役型受容体を標的とした薬剤の創製が提唱されている (*Trends Pharmacol. Sci.* (97) 18:430, *Br. J. Pharm.* (98) 125:1387)。すなわち、遺伝子操作によって同定されたオーファン G 蛋白質共役型受容体を、細胞内セカンドメッ

- 3 -

センジャーである cAMP, Ca²⁺の変化を指標とした機能スクリーニングにより生理的アゴニストを発見し、生体内機能解析を行うというものである。この際、化合物ライブラリーを利用して、スクリーニングをハイスループット化することにより、オーファン G 蛋白質共役型受容体に対する特異的な代替（surrogate）アゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発も理論的には可能となる。

発明の開示

本発明は、このような G 蛋白質共役型受容体を取り巻く現状に鑑みてなされたものであり、その目的は新規な G 蛋白質共役型受容体およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することにある。さらにこれら分子を薬剤開発研究の標的として提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために銳意研究を重ねた結果、ヒト組織 cDNA を鋳型にしたポリメラーゼ連鎖反応を実施することにより、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する 9 種類の新規遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング、あるいはこれら遺伝子が関連する疾患の診断に利用し得る。

即ち、本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

(1) グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA、

- 4 -

(b) 配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、

(c) 配列番号：1から4、17から21のいずれかに記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、

(d) 配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、

(2) 配列番号：1から4、17から21のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA、

(3) (1) または (2) に記載のDNAを含有するベクター、

(4) (1) または (2) に記載のDNAまたは(3)に記載のベクターを保持する形質転換体、

(5) (1) または (2) に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド、

(6) (4) に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、(5)に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (5) に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、

(a) (5) に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) (5) に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で(5)に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

- 5 -

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(9) (5) に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、(8) または (9) に記載の方法、

(11) (5) に記載の蛋白質に結合する抗体、

(12) (7) から (10) のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物、および

(13) (12) に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物、および

(14) 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の治療のための、(13) に記載の医薬組成物、

(15) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド、

(16) 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断方法であって、被検者由来の該疾患に関連した組織における (1) に記載の DNA の発現、または被検者における (1) に記載の DNA の変異を検出することを含む方法、

- 6 -

(17) (11)に記載の抗体または(15)に記載のヌクレオチドを含む、癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断薬、を提供するものである。

なお、本発明において「G蛋白質共役型受容体」とは、GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体を指す。

本発明において「リガンド」とは、G蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する生理的物質を指す。ここで「生理的物質」とは、生体内でG蛋白質共役型受容体に結合している化合物を指す。

本発明において「アゴニスト」とは、G蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達しうる化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明において「アンタゴニスト」とは、リガンドがG蛋白質共役型受容体に結合すること、もしくは細胞内にシグナルを伝達することを阻害する化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明は、新規なG蛋白質共役型受容体および該蛋白質をコードするDNAを提供する。本発明に含まれる、本発明者等により単離された9のヒト由来のcDNAクローニング、「GPRv8」、「GPRv12」、「GPRv16」、「GPRv21」、「GPRv40」、「GPRv47」、「GPRv51」、「GPRv71」、「GPRv72」と命名した（必要に応じてこれらクローニングをまとめて「GPRv」と称する）。これらcDNAの塩基配列を配列番号：5から8、22から26に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：1から4、17から21に示す。

BLAST検索の結果、GPRv cDNAがコードする蛋白質は、いずれも既知のG蛋白質共役型受容体と有意なアミノ酸配列上の相同性を示した。具体的には、「GPRv8」はHUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (P47901, 424aa)に対して36%の相同性を、「GPRv12」はRAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (P31388, 436aa)に対して27%の相同性を、「GPRv16」はMOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (P56479

- 7 -

, 348aa)に対して 28%の相同意を、「GPRv21」は BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P79113, 384aa)に対して 30%の相同意を、「GPRv40」は OXYTOCIN RECEPTOR (P97926, 388aa)に対して 34%の相同意を、「GPRv47」は GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して 43%の相同意を、「GPRv51」は PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749, 343aa)に対して 37%の相同意を、「GPRv71」は Chicken P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907, 328aa)に対して 45%の相同意を、「GPRv72」は ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (O02824, 466aa)に対して 30%の相同意をそれぞれ示した。

また、本発明者等が単離した GPRv cDNA がコードする蛋白質（以下、「GPRv 蛋白質」と称することがある）は、いずれも G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持していた。これら事実から、GPRv cDNA は、いずれも G 蛋白質共役型受容体ファミリーに属する蛋白質をコードしていると考えられる。G 蛋白質共役型受容体は、そのリガンドの作用により G 蛋白質の活性化を通じて細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性を有しており、上記したように遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系などの非常に多くの領域の疾患に関連している。従って、GPRv 蛋白質は、GPRv 蛋白質の機能を調節するアゴニストやアンタゴニストなどのスクリーニングに利用することができ、上記疾患に対する医薬品の開発の重要な標的となる。

本発明は、また、GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質が GPRv 蛋白質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。GPRv 蛋白質が持つ生物学的特性としては、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性が挙げられる。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって Ca^{2+} を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の 3 種類のカテゴリーに分類される (*Trends Pharmacol. Sci.* (99) 20:118)。

- 8 -

従って、対象となる蛋白質が GPR_v 蛋白質と同等の生物学的特性を有しているか否かは、例えば、その活性化による細胞内の cAMP 濃度もしくはカルシウム濃度の変化を検出することにより評価することが可能である。

GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の 1 つの態様としては、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5))が含まれる。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、GPR_v 蛋白質のアミノ酸配列（配列番号：1 から 4、17 から 21）において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより変異した蛋白質であって、GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。これら蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、GPR_v 蛋白質の機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の 10% 以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5% 以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1 % 以内であると考えられる。

GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子增幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4)を利用して GPR_v 蛋白質をコードする DNA 配列（配列番号：5 から 8、22 から 26）またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA 試料から、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることは、通常行いうことである。このように GPR_v 蛋白質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされる

- 9 -

蛋白質であって、GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。

このような蛋白質を単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を単離するためのストリンジエントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される DNA がコードする蛋白質は、通常、GPR_v 蛋白質とアミノ酸配列において高い相同意を有する。高い相同意とは、少なくとも 40% 以上、好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 80% 以上（例えば、90% 以上や 95% 以上）の配列の相同意を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLAST に基づいて BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメータはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて

- 1 0 -

BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.>)。

また、遺伝子増幅技術 (PCR) (*Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4*) を用いて GPR_v 蛋白質をコードする DNA 配列 (配列番号 : 5 から 8、22 から 26) の一部を基にプライマーを設計し、GPR_v 蛋白質をコードする DNA 配列と相同性の高い DNA 断片を単離し、該 DNA を基に GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、リガンドに結合するがシグナル伝達を行なわないペプチドが含まれる。このようなペプチドを基に作製したアフィニティーカラムは、リガンドのスクリーニングに好適に用いることができる。また、本発明の蛋白質の部分ペプチドは、抗体作製に用いることも可能である。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。本発明の部分ペプチドは、通常、8 アミノ酸残基以上、好ましくは 12 アミノ酸残基以上（例えば、15 アミノ酸残基以上）である。

本発明の蛋白質は、組換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードする DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することができる。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる(*Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Sectio*

- 11 -

n 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) *NAR* 17:3129-3144」参照）などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA としては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA なども含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。本発明の DNA は、上記のように、GPR_v 蛋白質をコードする DNA 配列（配列番号：5 から 8、22 から 26）あるいはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら DNA 配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター (Stratagene 社製) などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内で蛋白質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター (プロメガ社製)、大腸菌であれば pET ベクター (Invitrogen 社製)、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (*Mol Cell Biol.* 8:466-472(1988)) などが好ましい。ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current

- 12 -

protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

また、本発明は、本発明のDNAまたは本発明のベクターを保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。蛋白質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞などを例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNA(配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖)に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T(ただしRNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは15bp～35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15bpの鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明の蛋白質をコードする

- 13 -

DNA に特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジエントな条件下で、本発明の蛋白質をコードする DNA (配列番号：5 から 8、22 から 26) とハイブリダイズし、他の蛋白質をコードする DNA とはハイブリダイズしないことを意味する。

これらヌクレオチドは、本発明の蛋白質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、これらヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションや RT-PCR により、本発明の蛋白質をコードする DNA の発現異常を検査することができる。これらヌクレオチドは、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の検査への利用が考えられる。また、これらヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により本発明の蛋白質をコードする DNA やその発現制御領域を増幅し、RFLP 解析、SSCP、シークエンシング等の方法により、DNA 配列の異常を検査・診断することができる。

また、これらヌクレオチドには、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンス DNA が含まれる。アンチセンス DNA は、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp、さらに好ましくは 500bp 以上の鎖長を有し、通常、3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。このようなアンチセンス DNA には、本発明の蛋白質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンス DNA は、例えば、本発明の蛋白質をコードする DNA (例えば、配列番号：5 から 8、22 から 26) の配列情報を基にホスホロチオエート法 (Stein, 1988 *Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res* 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

本発明のヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ隨伴ウイルスベクターなどのウ

- 14 -

イルスペクターやリポソームなどの非ウイルスペクターなどを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従い本発明の蛋白質のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成し、家兎に免疫することにより得ることが可能である (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12-11.13)。

モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、その脾臓細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞を調製し、該ハイブリドーマ細胞から得ることができる (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。本発明の抗体は、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の検査への利用が考えられる。

また、本発明の蛋白質に結合する抗体を、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。本発明の抗体は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストとして作用し得る。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス（例えば、「Functional transp

- 15 -

lant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al.(1997) *Nat.Genet.* 15:146-156」参考)に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組換えによって調製することができる(*Methods in Enzymology* 203, 99-121(1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質を利用した、本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、種々のG蛋白質共役型受容体のリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド(例えば、ケミカルファイアルに登録されているもの)あるいはファージ・ディスプレイ法(*J.Mol.Biol.* (1991) 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、本発明の蛋白質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ本発明の蛋白質に結合する化合物を精製する方法、ウエストウエスタンプロットティング法など多くの公知の方法を利用することができる。これら方法を利用する場合には、被検試料は適宜標識し、この標識を利用して本発明の蛋白質との結合を検出することができる。また、これら方法の他に、本発明の蛋白質を発現する細胞膜を調製して、これをチップ上に固定し

- 16 -

、リガンド結合時に三量体型 GTP 結合蛋白質が解離する事を、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) の変化で検出する方法 (*Nature Biotechnology* (99) 17:1105) を用いることも可能である。

また、被検試料と本発明の蛋白質との結合活性は、被検試料が細胞表面に発現させた本発明の蛋白質へ結合することにより生じる細胞における変化を指標に検出することもできる。このような変化としては、例えば、細胞内の Ca^{2+} レベルの変化や cAMP レベルの変化が挙げられるが、これらに制限されない。具体的には、G 蛋白質共役型受容体に対するアゴニスト活性は GTP γ S 結合法により測定できる。

この方法の 1 つの実施例として、G 蛋白質共役型受容体を発現させた細胞膜を 20mM HEPES (pH7.4), 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 50 μM GDP 溶液中で、³⁵S で標識された GTP γ S 400pM と混合させ、被検試料存在下と非存在下でインキュベーション後、濾過 (filtration) をを行い、結合した GTP γ S の放射活性を比較する手法を用いることができる。

また G 蛋白質共役型受容体は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達するシステムを共有している。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 Ca^{2+} を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の 3 種類に分類される。このことを応用して Gq 蛋白 α サブユニットと他の G 蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、あるいは promiscuous な G α 蛋白質、G α 15、G α 16 を用いてリガンドスクリーニングの際の陽性シグナルを Gq の細胞内伝達経路である、 Ca^{2+} 上昇に帰結させることができる。上昇した Ca^{2+} レベルは、TRE (TPA responsive element) または MRE (multiple responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系、Fura-2、Fluo-3 などの染色指示薬そして蛍光蛋白 aequorin などの変化を指標として検出ができる。同様に、Gs 蛋白 α サブユニットと他の G 蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、陽性シグナルを Gs の細胞内伝達経路である、cAMP

- 17 -

上昇に帰結させ、CRE(cAMP-responsive element)を上流に有するレポーター遺伝子系での変化を指標とすることも可能である (*Trends Pharmacol. Sci.* (99) 20:118)。

このスクリーニング系において本発明の蛋白質を発現させる宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられるが、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞などを例示することができる。本発明の蛋白質を脊椎動物細胞で発現させるためのベクターとしては、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列や複製起点等を有するものを好適に用いることができる。例えば、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (*Mol. Cell. Biol.* (1981) 1,854-864) や、pEF-BOS (*Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322)、pCDM8 (*Nature* (1987) 329, 840-842)、pCEP4 (Invitrogen 社) などは、G 蛋白質共役型受容体を発現させるのに有用なベクターである。ベクターへの本発明の DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。また、宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、Fu GENE6 試薬 (ペーリンガーマンハイム社)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法により、リガンドが単離されれば、本発明の蛋白質とリガンドの相互作用を阻害する化合物のスクリーニングが可能となる。従って、本発明は、また、本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質また

- 18 -

はその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程(a)で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、コンビナトリアル・ケミストリ一技術 (*Tetrahedron* (1995) 51, 8135-8137) によって得られた化合物群、あるいはファージ・ディスプレイ法 (*J.Mol.Biol.* (1991) 222, 301-310) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、あるいはアフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、リガンドを放射性同位元素などで標識して、被検試料の存在下において本発明の蛋白質と接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、本発明の蛋白質とリガンドとの結合活性を低下させる化合物を、該リガンドに付された標識を基に検出する方法を用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に、細胞内の変化を指標にスクリーニングすることも可能である。即ち、本発明の蛋白質を発現する細胞に被検試料の存在下でリガンドを接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、該細胞における変化を減少させる化合物を選択することにより、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同

- 19 -

様に調製することができる。このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補となる。

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、(b) 該リガンドの本発明の蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程(b)で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスリーニング方法と同様に、コンビナトリアル・ケミストリー技術によって得られた化合物群、ファージ・ディスプレイ法などを応用して作成されたランダム・ペプチド群、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に調製することができる。被検試料接触後の細胞における変化は、上記のスクリーニング方法と同様に、細胞内の Ca^{2+} レベルや cAMP レベルの変化を指標に検出することができる。また、細胞内のシグナル伝達を検出する場合には、ルシフェラーゼなどをレポーター遺伝子とするレポーターアッセイ系等の測定系を利用して検出することも可能である。

この検出の結果、被検試料非存在下においてリガンドを接触させた場合の細胞における変化と比較して、被検試料を接触させた場合における細胞における変化が抑制されていれば、用いた被検試料は、本発明の蛋白質の活性を阻害する化合

- 2 0 -

物であると判定される。逆に、被検試料が該細胞における変化を増強させれば、該化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進する化合物であると判定される。なお、ここでいう「本発明の蛋白質の活性の促進または阻害する」とは、本発明の蛋白質に対する直接的な作用であると、間接的な作用であるとを問わず、結果として本発明の蛋白質の活性が促進または阻害されることを指す。従って、このスクリーニングにより単離される化合物には、本発明の蛋白質またはリガンドに作用してこれらの結合を阻害または促進することにより本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物の他、これらの結合自体を阻害または促進しないが、結果として本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物も含まれる。このような化合物には、例えば、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害しないが、細胞内のシグナル伝達経路を阻害若しくは促進する化合物が含まれる。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、眼軟膏等の製剤として経口または非経口に適した形態で処方される。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。本発明のスクリーニング方法により単離される化合物は、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の治療への応用が期待される。

- 21 -

本発明は、また、本発明の GPR_v 蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することを特徴とする、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の診断方法を提供する。

本実施例において、本発明の GPR_v 蛋白質をコードする遺伝子が、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病に関連した患部組織において、正常組織と比較して有意に発現レベルが相違することが見出された。従って、被検者のこれら組織における、本発明の GPR_v 蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することにより、これら疾患の診断を行うことが可能である。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳の双方が含まれる。

本発明の診断方法は、例えば、以下の如く実施することができる。

生検により採取した組織に一部や血液サンプルなどから、常法により RNA を抽出し、実施例で示した定量的 PCR、ノーザンハイブリダイゼイション、あるいはドットプロットハイブリダイゼイションなどにより GPR_v mRNA の定量を行い、診断することが可能である。また、上記組織から蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法を用いた GPR_v 蛋白質の定量、あるいは、非侵襲な方法として、GPR_v 蛋白質に結合する化合物や抗体を標識したものを被検患者に投与し、PET（ポジトロンエミッショントモグラフィー）などで検出により診断することも可能である。

この診断の結果、被検者由来の組織における遺伝子の発現が、上記疾患に罹患した患者由来の組織における遺伝子の発現と、同一の傾向（例えば、正常組織と比較した遺伝子の発現レベルの上昇または低下）を示せば、該被検者は、疾患に罹患している、または罹患のおそれがあると判定される。

例えば、GPR_{v8} は結腸で発現が認められるが、結腸癌でこの発現は顕著に上昇する。従って、被検者の結腸組織において、高レベルの GPR_{v8} の発現が認められた場合、この被検者は、結腸癌の疑いがある。また、正常の脾臓および子宮で発現が検出できなかったが、癌化で中程度発現した。従って、被検者の脾臓また

- 2 2 -

は子宮において、GPRv8 の発現が認められた場合、この被検者は卵巣癌または子宮癌の疑いがある。

GPRv12 は正常卵巣および精巣では発現が検出できなかったが、癌化で発現が検出できた。また、アルツハイマー病では海馬での発現が減少した。従って、被検者の卵巣または精巣において、GPRv12 の発現が認められた場合、この被検者は、卵巣癌または精巣癌の疑いがある。同様に、被検者の海馬において、正常値より低レベルの GPRv12 の発現が認められた場合、この被検者は、アルツハイマー病の疑いがある。

GPRv16 は、結腸で発現しているが、癌化で発現が検出できなくなった。脳では癌化で発現が増加した。肝臓では肝硬変により発現が検出できなくなった。アルツハイマー病の脳では海馬で発現が増強した。従って、被検者の結腸において正常値より低レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌の疑いがある。また、脳において、正常値より高レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv21 は、癌化により結腸及び精巣での発現が検出できなくなった。従って、被検者の結腸または精巣において正常値より低レベルの GPRv21 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または精巣癌の疑いがある。

GPRv40 は、癌化により脳、精巣での発現が増加し、肝硬変により発現が減少した。従って、脳や精巣において正常値より高レベルの GPRv40 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌や精巣癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv40 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。

- 2 3 -

GPRv47は、癌化により脳、腎臓での発現が増加し、精巣での発現が減少した。肝臓での発現が肝硬変で検出できなくなった。従って、脳や腎臓において正常値より高レベルのGPRv47の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌または腎臓癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルのGPRv47の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。

GPRv51は、結腸や精巣において癌化により発現が減少した。肝硬変の肝臓でも正常と比較して発現が減少した。アルツハイマー病において海馬で発現が増大した。従って、結腸や精巣において正常値より低レベルのGPRv51の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または精巣癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルのGPRv51の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルのGPRv51の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv71は、癌化により結腸および腎臓での発現が減少し、肝硬変の肝臓では発現が検出できなくなった。アルツハイマー病では前頭葉での発現が減少した。従って、結腸または腎臓において正常値より低レベルのGPRv71の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または腎臓癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルのGPRv71の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、前頭葉において正常値より低レベルのGPRvの発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv72は、結腸では強く発現しているが癌化で発現が検出できなくなった。アルツハイマー病の海馬で発現が増大した。従って、結腸において正常値より低レベルのGPRv72の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルのGPRv72の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

また、本発明のGPRv蛋白質をコードする遺伝子の変異により、上記疾患が発症することも考えられる。従って、本発明のGPRv蛋白質をコードする遺伝子の

- 24 -

変異を検出することにより、上記疾患の診断を行なうことも可能であると考えられる。

このような遺伝子診断は、例えば、以下の如く実施することができる。

診断用の核酸はゲノム DNA または cDNA を直接にあるいは PCR もしくはその他の增幅法を用いて増幅してもよい。正常遺伝子との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅 DNA と GPRv をコードする DNA をハイブリダイズさせ融解温度の差などにより点突然変異を同定することができる。DNA 配列の相違は、変性物質含有または不含のゲル中の DNA フラグメントの電気泳動の移動度の変化を検出することや、直接的な DNA 塩基配列決定により検出できる。

この診断の結果、被検者における GPRv 蛋白質をコードする遺伝子が正常型と比較して変異していた場合、該被検者は上記疾患の疑いがあると判定される。

即ち、本明細書記載の方法により GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の変異、 mRNA や蛋白質の発現の増加や減少を検出することにより、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の診断方法またはかかる疾患に対する感受性の診断方法が提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、「GPRv8」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR に対し 36% の相同性を示した。

図 2 は、「GPRv12」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR に対し 27% の相同性を示した。

- 2 5 -

図3は、「GPRv16」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1に対し28%の相同性を示した。

図4は、「GPRv21」のアミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2に対して30%の相同性を示した。

図5は、「GPRv40」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。OXYTOCIN RECEPTOR (P97926)に対して34%の相同性を示した。

図6は、「GPRv47」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178)に対して43%の相同性を示した。

図7は、「GPRv51」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749)に対して37%の相同性を示した。

図8は、「GPRv71」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907)に対して45%の相同性を示した。

図9は、「GPRv72」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (002824)に対して30%の相同性を示した。

図10は、GPRv8のハイドロバシープロットを示す図である。

図11は、GPRv8と類似ファミリーとのアライメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。
{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

- 2 6 -

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHK}

図12は、図11の続きである。

図13は、GPRv12のハイドロバシープロットを示す図である。

図14は、GPRv12とAF208288のアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}
'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHK}

図15は、GPRv16のハイドロバシープロットを示す図である。

図16は、GPRv16のHMMPFAM、膜貫通領域およびS-S結合についてまとめた図である。

***はHMMPFAMの結果7tm_1とアサインされた領域を示す。

###は膜貫通領域を示す。

@はS-S結合を形成するCysを示す。

図17は、GPRv21のハイドロバシープロットを示す図である。

図18は、GPRv21とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}
'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHK}

- 27 -

図19は、図18の続きである。

図20は、GPRv40のハイドロバシープロットを示す図である。

図21は、GPRv40のHMMFAM、膜貫通領域およびS-S結合についてまとめた図である。

***はHMMFAMの結果7tm_1とアサインされた領域を示す。

###は膜貫通領域を示す。

@はS-S結合を形成するCysを示す。

図22は、GPRv47のハイドロバシープロットを示す図である。

図23は、GPRv47とその類似タンパクのアライメントを示す図である。

'*'はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。<{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}

'..'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。<{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

図24は、図23の続きである。

図25は、図24の続きである。

図26は、GPRv51のハイドロバシープロットを示す図である。

図27は、GPRv51と類似タンパクとのアライメントを示す図である。

'*'はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。<{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}

'..'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。<{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

図28は、GPRv71のハイドロバシープロットを示す図である。

- 2 8 -

図29は、GPRv71とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。
{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}
'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。
{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

図30は、図29の続きである。

図31は、GPRv72のハイドロバシープロットを示す図である。

図32は、GPRv72とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。
{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}
'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。
{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

図33は、図32の続きである。

図34は、図33の続きである。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al.(1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

[実施例1] 新規G蛋白質共役型受容体をコードする遺伝子の単離

- 2 9 -

本発明の新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPRv8, GPRv12, GPRv16, GPRv21, GPRv40, GPRv47, GPRv51, GPRv71, GPRv72) をコードする全長 cDNA は、PCR により取得した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv8 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCCAGC CAACTCACAGAGGGCAGCT-3' (配列番号 : 9) 、リバースプライマーとして 5'-CTA GATGAATTCTGGCTTGGACAGAAC-3' (配列番号 : 10) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94°C (2.5 分) の後、94°C (30 秒) / 60°C (30 秒) / 72°C (1 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号 : 5 に示す。

同配列は 1116 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 5 の第 1 番目から第 1116 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (371 アミノ酸) を配列番号 : 1 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv12 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGG CCCCCGGCGAGGCGCTGCTGGCGG-3' (配列番号 : 11) 、リバースプライマーとして 5'-TCAGTGTGTCTGCTGCAGGCAGGAATCA-3' (配列番号 : 12) を用いた。PCR は Pyro best DNA polymerase (宝酒造) を用い 5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返

- 3 0 -

した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列は、ジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号： 6 に示す。

同配列は 1092 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号： 6 の第 1 番目から第 1092 番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（363 アミノ酸）を配列番号： 2 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv16 の増幅にはヒト脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCTGGCA GCTGCCTTGCAGACTCTAAC-3' (配列番号： 13) 、リバースプライマーとして 5'-CTATTTAACACCTTCCCCGTCTCTTGATC-3' (配列番号： 14) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社) を用い、94°C (2 分) の後、94°C (30 秒) / 60°C (30 秒) / 72°C (1 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号： 7 に示す。

同配列は 1260 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号： 7 の第 1 番目から第 1260 番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（419 アミノ酸）を配列番号： 3 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

- 3 1 -

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv21 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGA CCACCATGGGGTTCATGGATG-3' (配列番号 : 15) 、リバースプライマーとして 5'- TTATTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTTC-3' (配列番号 : 16) を用いた。PCR は Pyro best DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号 : 8 に示す。

同配列は 1182 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 8) を持つている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (393 アミノ酸) を配列番号 : 4 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv40 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGG ATCTCTTAGCCCCCTCAATTC-3' (配列番号 : 27) 、リバースプライマーとして 5'- CTAGAAGGCACTTTCGCAGGAGCAAGGC-3' (配列番号 : 28) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、98°C (2.5 分) の後、98°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.3 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied

- 3 2 -

Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：22に示す。

同配列は 1305 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：22）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（434 アミノ酸）を配列番号：17に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G蛋白質共役型受容体 GPRv47 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鑄型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGA GTCCTCACCCATCCCCAGTCATC-3' (配列番号：29) 、リバースプライマーとして 5'-TCATGACTCCAGCCGGGTGAGGCAGCAG-3' (配列番号：30) を用いた。PCR は Py robust DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 50° C (30 秒) / 72° C (1.5 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.4 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：23に示す。

同配列は 1356 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：23）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（451 アミノ酸）を配列番号：18に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G蛋白質共役型受容体 GPRv51 の増幅にはヒト精巣由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鑄型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGAACC AGACTTTGAATAGCAGTGG-3' (配列番号：31) 、リバースプライマーとして 5'-TC

- 3 3 -

AAGCCCCATCTCATTGGTGCCCACG-3' (配列番号：32) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、98° C (2.5 分) の後、98° C (30 秒) / 50 ° C (30 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：24 に示す。

同配列は 966 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号：24) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (321 アミノ酸) を配列番号：19 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv71 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGA AGGTGGACATGAATACATCAC-3' (配列番号：33) 、リバースプライマーとして 5'-TTACCCAGATCTGTTCAACCCTGGGCATC-3' (配列番号：34) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2.5 分) の後、98° C (5 秒) / 72° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 70° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：25 示す。

同配列は 1002 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号：25) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (333 アミノ酸) を配列番号：20 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体

- 3 4 -

の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv72 の増幅にはヒトゲノム DNA (Clontech 社) を鋳型 DNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGACGTCCACCTGCACCAACAGCACG C-3' (配列番号 : 35) 、リバースプライマーとして 5'-TCAAGGAAAAGTAGCAGAAT CGTAGGAAG-3' (配列番号 : 36) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 55° C (30 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.5 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになつた配列を配列番号 : 26 に示す。

同配列は 1527 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 26) を持つてゐる。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (508 アミノ酸) を配列番号 : 21 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

[実施例 2] 新規 G 蛋白質共役型受容体のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索

「GPRv8」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 に示した。「GPRv8」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では HUMAN VASOPRESSIN V1 B RECEPTOR (P47901, 424aa) に対して、36%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv8」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv12」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 2 に示した。「GPRv12」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では RAT 5-HYDROXYTRYPTA

- 3 5 -

MINE 6 RECEPTOR (P31388, 436aa)に対して、27%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv12」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv16」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 3 に示した。「GPRv16」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (P56479, 348aa)に対して、28%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv16」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv21」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 4 に示した。「GPRv21」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では「GPRv21」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P79113, 384aa)に対して 30%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv21」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv40」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 5 に示した。「GPRv40」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、OXYTOCIN RECEPTOR (P97926, 388aa)に対して 34%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv40」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv47」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 6 に示した。「GPRv47」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して 43%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv47」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv51」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 7 に示した。「GPRv51」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749, 343aa)に対して 37%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv51」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

- 3 6 -

「GPRv71」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 8 に示した。「GPRv71」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、Chicken P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907, 328aa)に対して 45%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv71」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv72」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 9 に示した。「GPRv72」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (O02824, 466aa)に対して 30%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv72」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

[実施例 3] 発現組織解析

1. 試薬

1.1 定量用 polymerase chain reaction (PCR) プライマー及び TaqMan プローブ：センスプライマー、アンチセンスプライマー、及び TaqMan プローブは PE Biosystems の遺伝子解析ソフトウェア Primer Express version 1.0 を用いて設計した。通常のプライマーはアマシャム・ファルマシア・バイオテク（東京）に、TaqMan プローブは PE Biosystems Japan に製造を依頼した。なお、TaqMan プローブは、5' 端にはリポーター色素 FAM を、3' 端にはクエンチャータ mra を結合させた。プライマー及び TaqMan プローブの塩基配列を下に示す。

GPRv8 用合成 DNA

PCR プライマー G8.957F : CCAGGAGCGTTCTATGCCT (配列番号 : 37)

G8.1082R : TGTGATCTTGCTCCCTGCA (配列番号 : 38)

TaqMan プローブ GPRv8.987T : TCAGAACCTGCCAGCATTGAATAGTGCC (配列番号 : 39)

GPRv12 用合成 DNA

PCR プライマー G12.794F : ATCTGCTTGGCCCCGTATGT (配列番号 : 40)

- 3 7 -

G12.903R : ACCGCCTTGCTGTAGGTCAG (配列番号 : 4 1)

TaqMan プローブ GPRv12.834T:TCGTGCCCTTCGTACCGTGAA (配列番号 : 4 2)

GPRv16 用合成 DNA

PCR プライマー G16.1133F : CCCAGCATCCATACCAAGAAAA (配列番号 : 4 3)

G16.1254R : CTGTGTCCCCTCTCATGCCAAA (配列番号 : 4 4)

TaqMan プローブ GPRv16.1193T:TGAGAAGGCAGAGATTCCCATCCTTCCT (配列番号 : 4 5)

GPRv21 用合成 DNA

PCR プライマー G21.989F : TCGCCATGAGAACAGCAT (配列番号 : 4 6)

G21.1114R : CACTGGACTTACCGCCATTGT (配列番号 : 4 7)

TaqMan プローブ GPRv21.1064T:AGATCATGTTGCTCCACTGGAAGGCTTCT (配列番号 : 4 8)

GPRv40 用合成 DNA

PCR プライマー G40.16F : GGATCTTTAGCCCCCTCAATTC (配列番号 : 4 9)

G40.99R : AAGGTCAGGTTGAGACCCCAG (配列番号 : 5 0)

TaqMan プローブ GPRv40.53T:AACATTTCCGTGCCCATTTGCTGG (配列番号 : 5 1)

GPRv47 用合成 DNA

PCR プライマー G47.1292F : GCTGTTGACTTTCGAATCCCA (配列番号 : 5 2)

G47.1393R : ACGGAGGTAGCTGTCTGACATGA (配列番号 : 5 3)

TaqMan プローブ GPRv47.1336T:TGAGTTCTGGAGCAGCAACTCACCA (配列番号 : 5 4)

GPRv51 用合成 DNA

PCR プライマー G51.190F : GGCTTTCGAATGCACAGGAA (配列番号 : 5 5)

G51.276R : GGAAGCCATGCTGAAGAGGA (配列番号 : 5 6)

TaqMan プローブ GPRv51.214T:TTCTGCATCTATCCTAACCTGGCGG (配列番号 : 5 7)

- 3 8 -

GPRv71 用合成 DNA

PCR プライマー G71.746F : TGGCCTCTCACCCCTCTGTTT (配列番号 : 58)

G71.841R : ATCAAGAGCTGGCAGTCCTGA (配列番号 : 59)

TaqMan プローブ GPRv71.775T: TCCATATCACTCGCTCCTTACCTCACCA (配列番号 : 60)

GPRv72 用合成 DNA

PCR プライマー G72.101F : CCAAAATGCCCATCAGCCT (配列番号 : 61)

G72.190R : GCACTATGTTGCCGACGAAA (配列番号 : 62)

TaqMan プローブ GPRv72.132T: CATCCGCTAACCGTGCTGGTTATCT (配列番号 : 63)

1.2 疾患由来 cDNA

同一患者の腫瘍および正常組織由来の cDNA は、Clontech の Matched cDNA Pairs を用いた。組織は肺、胃、結腸、卵巣、前立腺、子宮、および腎臓である。

腫瘍患者および正常成人の脳、脾臓、精巣、肝硬変患者および正常成人の肝臓、ループス病患者の腎臓、アルツハイマー病 (AD) 患者および正常成人の海馬及び前頭葉に由来する cDNA は、BioChain Institute から購入して用いた。

1.3 定量 PCR 反応用試薬 :

TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems) を使用した。内部標準測定用として TaqMan β -actin Control Reagents (PE Biosystems) を用いた。

2. 定量 PCR 反応 :

1) 鑄型 cDNA の希釈

BioChain の cDNA は水にて 50 倍希釈し、Clontech の cDNA は水にて 5 倍希釈して用いた。

2) マスターミックスの調製

以下の組成の反応溶液を調製した。

- 3 9 -

| | 反応容量 | 調製容量 |
|----------------------|--------|---------|
| 2×Master Mix | 12.5μl | 1380μl |
| センスプローライマー (50μM) | 0.5μl | 55.2μl |
| アンチセンスプローライマー (50μM) | 0.5μl | 55.2μl |
| TaqMan Probe (5μM) | 1μl | 110.4μl |
| 錆型 cDNA | 2.5μl | |
| 精製水 | 8μl | 883.2μl |
| 総量 | 25μl | 2484μl |

3) PCR 反応溶液の作成

マスターミックス溶液 54μl に錆型 cDNA を 6μl 加えた後、定量 PCR 装置用の PCR プレートに 25μl ずつ duplicate でサンプル用ウェルに分注した。Non template control 用の 2 ウェルには上記マスターミックスを 25μl ずつ分注した。標準曲線の作成には pCEP4 ベクターにサブクローニングした cDNA を 100pg/μl から始めて 1/10 ずつ 8 段階希釈したものを利用した。2)のマスターミックス 54μl と Standard 液 6μl を加えたものから、25μl ずつを Standard 用ウェルに分注した。即ち、Standard 用ウェルには最も高濃度のもので 250pg、低濃度で 25ag(a: atto, 10^{-18}) のプラスミド DNA が入ることになる。8 連のキャップを装着した後、軽く遠心し気泡を除いた。

4) PCR 反応

プレートを定量 PCR 装置 (GeneAmp 5700 Sequence Detection System : PE Biosystems) にセットし、以下の運転プログラムで反応させた。

- ① 50°C, 2 分 : 1 サイクル
- ② 95°C, 10 分 : 1 サイクル
- ③ 95°C, 15 秒 } : 50 サイクル
 60°C, 1 分 }

5) 定量解析

- 4 0 -

GeneAmp 5700 の操作マニュアルに従い、定量解析を行い出力した。

3. 結果およびまとめ：

ヒト正常および疾患患者の臓器由来 cDNA を用いた GPCR の発現プロファイルは、アクチン遺伝子の発現量を内部標準として相対的な比を求め、2 回の実験の平均を表 1 にまとめた。

- 41 -

表 1

| | relative copy number | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | GPRv8 | GPRv12 | GPRv16 | GPRv21 | GPRv40 | GPRv47 | GPRv51 | GPRv71 | GPRv72 |
| Brain Normal ¹⁾ | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| Tumor ¹⁾ | 5 | 2 | 11 | 0 | 23 | 76 | 2 | 5 | 0 |
| Lung Normal ¹⁾ | 0 | 0 | 1 | 0 | 11 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Tumor ¹⁾ | 1 | 0 | 1 | 0 | 11 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Stomach Normal ¹⁾ | 6 | 0 | 0 | 0 | 29 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Tumor ¹⁾ | 3 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 |
| Pancreas Normal ¹⁾ | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tumor ¹⁾ | 45 | 2 | 0 | 0 | 23 | 2 | 3 | 4 | 1 |
| Colon Normal ¹⁾ | 141 | 0 | 61 | 11 | 119 | 50 | 111 | 44 | 113 |
| Tumor ¹⁾ | 2766 | 0 | 0 | 0 | 110 | 21 | 6 | 2 | 0 |
| Ovary Normal ¹⁾ | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Tumor ¹⁾ | 0 | 4 | 0 | 0 | 21 | 1 | 3 | 3 | 0 |
| Uterus Normal ¹⁾ | 0 | 0 | 3 | 0 | 7 | 0 | 3 | 3 | 1 |
| Tumor ¹⁾ | 19 | 0 | 0 | 0 | 9 | 1 | 21 | 8 | 1 |
| Prostate Normal ¹⁾ | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 1 | 3 | 1 | 0 |
| Tumor ¹⁾ | 6 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 8 | 3 | 0 |
| Testis Normal ¹⁾ | 18 | 0 | 10 | 5 | 3 | 22 | 20 | 2 | 1 |
| Tumor ¹⁾ | 8 | 3 | 13 | 0 | 21 | 3 | 3 | 2 | 0 |
| Kidney Normal ¹⁾ | 9 | 0 | 0 | 0 | 29 | 0 | 27 | 3 | 5 |
| Tumor ¹⁾ | 9 | 0 | 0 | 0 | 28 | 10 | 15 | 0 | 0 |
| Lupus ¹⁾ | 25 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 0 |
| Liver Normal ¹⁾ | 0 | 0 | 10 | 0 | 27 | 11 | 13 | 5 | 1 |
| Cirrhosis ¹⁾ | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hippocampus Normal ¹⁾ | 6 | 12 | 4 | 0 | 40 | 113 | 2 | 5 | 2 |
| AD ¹⁾ | 16 | 1 | 50 | 3 | 111 | 63 | 55 | 12 | 27 |
| Frontal lobe Normal ¹⁾ | 3 | 2 | 8 | 0 | 16 | 140 | 3 | 8 | 1 |
| AD ¹⁾ | 2 | 1 | 1 | 0 | 9 | 29 | 2 | 2 | 0 |

3倍以上の発現変化が再現された場合、有意と考える。¹⁾印のある臓器由来 cDNA は BioChain から購入したものであり、印のない臓器由来 cDNA は Clontech から購入したものである。以下に、個々の遺伝子の疾患による発現変化をまとめ る。

GPRv8 は正常の脾臓および子宮では発現が検出できなかったが、癌化で中等度 発現した。結腸で強く発現するが、結腸癌でさらに強力に発現した。

GPRv12 は全体的に発現が弱かった。正常卵巣および精巣では発現が検出でき なかつたが、癌化で発現が検出できた。アルツハイマー病では海馬での発現が減 少した。

GPRv16 は、結腸で発現しているが、癌化で発現が検出できなくなった。脳で は癌化で発現が増加した。肝臓では肝硬変により発現が検出できなくなった。ア ルツハイマー病脳では海馬で発現が増強した。

- 4 2 -

GPRv21 は、発現は少ないが、癌化により結腸及び精巣での発現が検出できなくなつた。

GPRv40 は、癌化により脳、精巣での発現が増加した。肝硬変により発現が減少した。

GPRv47 は、癌化により脳、腎臓での発現が増加し、精巣での発現が減少した。肝臓での発現が肝硬変で検出できなくなつた。

GPRv51 は、結腸で強く発現しているが癌化により発現が減弱した。精巣では癌化により発現が減少した。肝硬変の肝臓でも正常と比較して発現が減少した。脳では発現が弱いが、アルツハイマー病において海馬で発現が増大した。

GPRv71 は、癌化により結腸および腎臓での発現が減少した。肝硬変の肝臓では発現が検出できなくなつた。アルツハイマー病では前頭葉での発現が減少した。

GPRv72 は、結腸では強く発現しているが癌化で発現が検出できなくなつた。脳では発現が弱いが、アルツハイマー病の海馬で発現が増大した。

[実施例 4] バイオインフォーマティクスによる GPRv8 の解析

1. GPRv8 のホモロジー検索

GPRv8 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 2 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv8 は GPCR と相同性を有する、新規なクローニングであることが判明した。GPRv8 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-3 9 未満のもの) を表 2 に示す。

- 4 3 -

表 2

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|--|
| AE003754 | 2e-68 | 43 | gene: "CG6111" - Drosophila melanogaster |
| AF147743 | 7e-43 | 33 | vasotocin VT1 receptor - Gallus gallus |
| AF184966 | 2e-42 | 33 | arginine vasotocin receptor - Platichthys flesus |
| X93313 | 4e-42 | 36 | mesotocin receptor - giant toad |
| X76321 | 8e-42 | 32 | vasotocin receptor - white sucker |
| X87783 | 4e-41 | 33 | isotocin receptor - white sucker |
| X64878 | 3e-40 | 32 | oxytocin receptor - H.sapiens |
| U82440 | 7e-40 | 32 | oxytocin receptor - Macaca mulatta |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv8 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv8 は 7 個の膜貫通部位 (TM 1~TM7) を有することが判明した (図 10)。

3. HMMPfam 検索

GPRv8 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv8 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 3 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 4 4 -

表 3

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|---------|--------|------|---|
| 7tm_1 | 164.2 | 5.1e-51 | 66 | 330 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit : 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score : この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect : この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from : 推定されたドメインの開始位置

Q to : 推定されたドメインの終了位置

Description : 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7を用いてGPRv8と表2のタンパクのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図11、12)。GPRv8は7個の膜貫通部位(### ###)を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys(@をつけたCys)を有することが判明した。

[実施例5] バイオインフォーマティクスによるGPRv12の解析

1. GPRv12のホモロジー検索

GPRv12のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表4に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv12はGPCRと相同性を有する、新規なクローニングであることが判明した。GPRv12のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-15未満のもの)を表4に示す。

- 45 -

表 4

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|---|
| AF208288 | 8e-88 | 50 | orphan G protein-coupled receptor GPR26 - <i>Rattus norvegicus</i> |
| L03202 | 2e-17 | 24 | 5-hydroxytryptamine receptor - rat |
| L41146 | 5e-17 | 23 | 5-HT6 serotonin receptor - <i>Rattus norvegicus</i> |
| S62043 | 2e-16 | 25 | serotonin receptor 6 - rat |
| L41147 | 2e-16 | 24 | 5-HT6 serotonin receptor - <i>Homo sapiens</i> |
| AF134158 | 4e-16 | 23 | serotonin 6 receptor - <i>Mus musculus</i> |
| L14856 | 4e-16 | 26 | somatostatin receptor 4 - Human |
| Y14627 | 5e-16 | 21 | Dopamine receptor - <i>Cyprinus carpio</i> |
| L07833 | 6e-16 | 26 | somatostatin receptor 4- <i>Homo sapiens</i> |
| AF069547 | 8e-16 | 21 | putative odorant receptor LOR4 - <i>Lampetra fluviatilis</i> |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv12 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J. Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv12 は 7 個の膜貫通部位 (TM1～TM7) を有することが判明した(図 13)。

3. HMMpfam 検索

GPRv12 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv12 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 5 に HMMpfam 検索の結果を示す。

- 4 6 -

表 5

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|---------|--------|------|--|
| 7tm_1 | 74.7 | 7.7e-23 | 22 | 294 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7 を用いて GPRv12 と orphan G protein-coupled receptor GPR26 - Rattus norvegicus (AF208288) とのアミノ酸配列のアライメントをおこなった（図 14）。GPRv12 は 7 個の膜貫通部位 (### ###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (@をつけた Cys) を有することが判明した。

[実施例 6] バイオインフォーマティクスによる GPRv16 の解析

1. GPRv16 のホモロジー検索

GPRv16 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al.(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 6 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv16 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv16 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e -18 未満のもの) を表 6 に示す。

- 4 7 -

表 6

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|---|
| AF042784 | 4e-20 | 23 | GALANIN RECEPTOR TYPE 2 - Mus musculus |
| U30290 | 4e-20 | 27 | galanin receptor GALR1 - Rattus norvegicus |
| U90657 | 6e-20 | 27 | GALANIN RECEPTOR TYPE 1 - mouse |
| AF042782 | 7e-20 | 25 | galanin receptor type 2 - Homo sapiens |
| U94322 | 1e-19 | 24 | galanin receptor type2 - Rattus norvegicus |
| AF077375 | 6e-19 | 23 | galanin receptor type2 - Mus musculus |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv16 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J. Kyte and R.F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.)によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv16 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した(図 15)。

3. HMM Pfam 検索

GPRv16 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMM PFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv16 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 7 に、HMM Pfam 検索の結果を示す。

- 4 8 -

表 7

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|--------|--------|------|--|
| 7tm_1 | 23.8 | 8.3e-7 | 155 | 306 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |
| 7tm_1 | 13.3 | 0.0017 | 53 | 133 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4.

3. と 4. の結果を図16にまとめた。GPRv16はGPCRに特徴的なS-S結合を形成するCys(@)を有することが判明した。

[実施例7] バイオインフォーマティクスによるGPRv21の解析

1. GPRv21のホモロジー検索

GPRv21のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al.,(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表8に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv21はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv21のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-35未満のもの)を表8に示す。

- 4 9 -

表 8

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|--|
| AL121755 | 0.0 | 89 | G-protein coupled receptor - Human |
| AF236082 | 0.0 | 83 | G-protein coupled receptor GPR73 - <i>Mus musculus</i> |
| M81490 | 9e-37 | 34 | neuropeptide receptor - <i>D.melanogaster</i> |
| U50144 | 3e-36 | 30 | type 2 neuropeptide Y receptor - <i>Bos taurus</i> |
| U42766 | 6e-36 | 29 | neuropeptide y2 receptor - Human |
| AF037444 | 8e-36 | 28 | cardioexcitatory receptor - <i>Lymnaea stagnalis</i> |
| D86238 | 8e-36 | 28 | neuropeptideY-Y2 receptor - <i>Mus musculus</i> |
| U42389 | 8e-36 | 29 | neuropeptide y/peptide YY receptor type 2 - human |
| U76254 | 8e-36 | 29 | neuropeptide Y receptor type 2 - Human |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv21 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.)によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv21 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した(図 17)。

3. HMMpfam 検索

GPRv21 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv21 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 9 に、HMMpfam 検索の結果を示す。

- 5 0 -

表 9

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|---------|--------|------|--|
| 7tm_1 | 188.1 | 1.6e-58 | 79 | 338 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7 を用いて GPRv21 と表 8 のタンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった（図 18、19）。GPRv8 は 7 個の膜貫通部位（### ###）を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (@をつけた Cys) を有することが判明した。

[実施例 8] バイオインフォーマティクスによる GPRv40 の解析

1. GPRv40 のホモジー検索

GPRv40 のアミノ酸配列を既知配列（既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である）に対して解析プログラム（BLAST2.0）（Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.）を用いて検索したところ、表 10 に示す配列とホモジーを有することが明らかになった。GPRv40 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv40 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム（blast2.0）を用いて検索した結果（E-value が e-11 未満のもの）を表 10 に示す。

- 5 1 -

表 10

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|---|
| D86599 | 1e-13 | 23 | oxytocin receptor - Mus sp. |
| U15280 | 4e-13 | 23 | oxytocin receptor - Rattus norvegicus |
| X76321 | 1e-12 | 22 | vasotocin receptor - white sucker |
| X64878 | 2e-12 | 21 | oxytocin receptor - H.sapiens |
| X87783 | 2e-12 | 21 | isotocin receptor - C.commersoni |
| D45400 | 3e-12 | 23 | vasopressin receptor V1b - rat |
| L37112 | 3e-12 | 24 | vasopressin receptor subtype 1b - Homo sapiens |
| U27322 | 6e-12 | 23 | arginine-vasopressin V1b receptor - Rattus norvegicus |
| U82440 | 6e-12 | 21 | oxytocin receptor - Macaca mulatta |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv40 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv40 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した(図 20)。

3. HMM Pfam 検索

GPRv40 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMM PFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv40 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 11 に、HMM Pfam 検索の結果を示す。

- 5 2 -

表 1 1

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|---------|--------|------|--|
| 7tm_1 | 26.5 | 1.1e-07 | 228 | 352 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |
| 7tm_1 | 18.1 | 5e-05 | 59 | 181 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4.

3. と 4. の結果を図 2 1 にまとめた。GPRv40 は GPCR に特徴的な S-S 結合を形成する Cys (@) を有することが判明した。

[実施例 9] バイオインフォーマティクスによる GPRv47 の解析

1. GPRv47 のホモジー検索

GPRv47 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 1 2 に示す配列とホモジーを有することが明らかになった。GPRv47 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv47 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-11 未満のもの) を表 1 2 に示す。

- 5 3 -

表 1 2

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|--|
| D43633 | 1e-85 | 41 | G protein-coupled seven-transmembrane receptor - Medaka fish |
| X98133 | 2e-28 | 27 | histamine H2 receptor - H.sapiens |
| M32701 | 3e-28 | 28 | histamine H2 receptor - Canine histamine |
| L41147 | 6e-28 | 31 | 5-HT6 serotonin receptor - Homo sapiens |
| U25440 | 8e-28 | 26 | histamine H2 receptor - Cavia porcellus |
| D49783 | 1e-27 | 28 | histamine H2 receptor - Human |
| U64032 | 2e-27 | 27 | alpha 1d adrenoceptor - Oryctolagus cuniculus |
| S73473 | 3e-27 | 28 | beta 3-adrenergic receptor - rats |
| M74716 | 4e-27 | 28 | beta-adrenergic receptor - Rat |
| S57565 | 6e-27 | 27 | histamine H2-receptor - rats |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv47 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv47 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した(図 2 2)。

3. HMMPfam 検索

GPRv47 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv47 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 1 3 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 5 4 -

表 13

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|---------|--------|------|--|
| 7tm_1 | 137.9 | 9.6e-43 | 59 | 341 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7を用いてGPRv47と類似タンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった（図23～25）。GPRv8は7個の膜貫通部位（### ###）を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys（@をつけたCys）を有することが判明した。

[実施例10] バイオインフォーマティクスによるGPRv51の解析

1. GPRv51のホモロジー検索

GPRv51のアミノ酸配列を既知配列（既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である）に対して解析プログラム（BLAST2.0）（Altschul, Stephen F. et al.(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.）を用いて検索したところ、表14に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv51はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv51のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム（blast2.0）を用いて検索した結果（E-valueがe-18未満のもの）を表14に示す。

- 55 -

表 1 4

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|--|
| M35297 | 4e-43 | 36 | G-protein coupled receptor - Rat |
| J03823 | 1e-42 | 34 | Rat mas oncogene, complete cds. |
| M13150 | 3e-40 | 34 | mas proto-oncogene - Human |
| X67735 | 1e-39 | 35 | Mas proto-oncogene - M.musculus mas |
| AL035542 | 1e-35 | 36 | MAS-related G protein-coupled receptor MRG - Human |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv51 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv51 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した(図 2 6)。

3. HMM Pfam 検索

GPRv51 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMM PFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv51 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 1 5 に HMM Pfam 検索の結果を示す。

表 1 5

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|---------|--------|------|---|
| 7tm_1 | 32.6 | 1.4e-09 | 44 | 78 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |
| 7tm_1 | 30.1 | 8.7e-09 | 104 | 276 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

- 5 6 -

Score : この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect : この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from : 推定されたドメインの開始位置

Q to : 推定されたドメインの終了位置

Description : 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv51とG-protein coupled receptor - Rat(M35297)とのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図27)。GPRv51は7個の膜貫通部位(### ###)を有することが判明した。

[実施例11] バイオインフォーマティクスによるGPRv71の解析

1. GPRv71のホモジー検索

GPRv71のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表16に示す配列とホモジーを有することが明らかになった。GPRv71はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv71のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-35未満のもの)を表16に示す。

- 5 7 -

表 1 6

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|---|
| AF069555 | 9e-44 | 44 | G protein-coupled receptor p2y3 - Meleagris gallopavo |
| X98283 | 9e-44 | 45 | P2Y PURINOCEPTOR 3 - G.domesticus |
| AF031897 | 6e-41 | 40 | P2Y nucleotide receptor - Meleagris gallopavo |
| X99953 | 1e-39 | 41 | P2Y PURINOCEPTOR 8 - X.laevis |
| D63665 | 2e-37 | 41 | novel G protein-coupled P2 receptor - Rat |
| Y14705 | 1e-36 | 40 | P2Y4 receptor gene - Rattus norvegicus |
| AJ277752 | 2e-36 | 41 | P2Y4 receptor - Mus musculus |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv71 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv71 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 28)。

3. HMMpfam 検索

GPRv71 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv71 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 1 7 に、HMMpfam 検索の結果を示す。

- 5 8 -

表 17

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|---------|--------|------|--|
| 7tm_1 | 90.6 | 7.6e-28 | 40 | 161 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv71とその類似タンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図29、30)。GPRv71は7個の膜貫通部位(### ###)を有することが判明した。

[実施例12] バイオインフォーマティクスによるGPRv72の解析

1. GPRv72のホモロジー検索

GPRv72のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR(Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表18に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv72はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv72のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-24未満のもの)を表18に示す。

- 5 9 -

表 1 8

| Hit (ID) | E-value | Identities % | Description |
|----------|---------|--------------|---|
| AF091890 | 4e-29 | 32 | G-protein coupled receptor RE2 - Homo sapiens |
| U81982 | 3e-25 | 30 | alpha 1a-adrenoceptor - Oryctolagus cuniculus |
| S71323 | 6e-25 | 32 | alpha-1A adrenergic receptor - Japanese medaka |
| D63859 | 6e-25 | 32 | alpha1A-adrenoceptor - Oryzias latipes |
| U07126 | 8e-25 | 29 | alpha1c adrenergic receptor - Rattus norvegicus |
| U03866 | 8e-25 | 30 | adrenergic alpha-1c receptor protein - Human |
| AF013261 | 8e-25 | 30 | alpha 1A adrenergic receptor isoform 4 - Homo sapiens |
| L31774 | 8e-25 | 30 | alpha-1C-adrenergic receptor - Human |
| D32202 | 8e-25 | 30 | alpha 1C adrenergic receptor isoform 2 - Human |
| D32201 | 8e-25 | 30 | alpha 1C adrenergic receptor isoform 3 - Human |
| D25235 | 8e-25 | 30 | alpha1C adrenergic receptor |

2. 膜貫通部位の予測

GPRv72 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv72 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した(図 3 1)。

3. HMM Pfam 検索

GPRv72 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMM PFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.org>)

- 6 0 -

wustl.edu/)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv72 は、7tm_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 19 に、HMM Pfam 検索の結果を示す。

表 19

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Description |
|-------|-------|---------|--------|------|---|
| 7tm_1 | 196.1 | 4.7e-61 | 48 | 454 | 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) |

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv72と表 18 のタンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった（図 32～34）。GPRv72は 7 個の膜貫通部位（### ###）を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys (@をつけたCys) を有することが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPRv8, GPRv12, GPRv16, GPRv21, GPRv40, GPRv47, GPRv51, GPRv71, GPRv72) 、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質の活性を修飾する化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の蛋白質やその遺伝子、または本発明の蛋白質の活性を修飾

- 6 1 -

する化合物は、本発明のG蛋白質共役型受容体蛋白質が関与する疾患の新しい
予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。

- 6 2 -

請求の範囲

1. グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記（a）から（d）のいずれかに記載の DNA。
 - (a) 配列番号：1から4、17から21のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。
 - (b) 配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。
 - (c) 配列番号：1から4、17から21のいずれかに記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。
 - (d) 配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA にストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA。
2. 配列番号：1から4、17から21のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA。
3. 請求項1または2に記載の DNA を含有するベクター。
4. 請求項1または2に記載の DNA または請求項3に記載のベクターを保持する形質転換体。
5. 請求項1または2に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド。
6. 請求項4に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項5に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
7. 請求項5に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であつて、
 - (a) 請求項5に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

- 6 3 -

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

8. 請求項 5 に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で請求項 5 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

9. 請求項 5 に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

11. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合する抗体。

12. 請求項 7 から 10 のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物。

13. 請求項 12 に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。

14. 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の治療のための、請求項 13 に記載の医薬組成物。

- 6 4 -

15. 配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド。

16. 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断方法であって、被検者由来の該疾患に関連した組織における請求項1に記載のDNAの発現、または被検者における請求項1に記載のDNAの変異追加しましたを検出することを含む方法。

17. 請求項11に記載の抗体または請求項15に記載のヌクレオチドを含む、癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断薬。

1 / 34

図 1

>sp|P47901|V1BR_HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (AVPR V1B) (VASOPRESSIN V3 RECEPTOR) (AVPR V3) (ANTIDIURETIC HORMONE RECEPTOR 1B).
Length = 424

Score = 316 (111.2 bits), Expect = 3.7e-41, Sum P(2) = 3.7e-41
Identities = 70/194 (36%), Positives = 115/194 (59%)

Query: 56 LWVLFVFTIVGNNSVLFSTWRR-KKKSRTFFFVQLAITDSFTGLVNILTDINWRFTGDF 114
L + V GN VL + + +K+SRM FV LA+TD L +L + W T F
Sbjct: 41 LATVLVLATGGNLAVLLTLGQLGRKRSRMHLFVLHLALTDLAVALFQVLPQLLWDITYRF 100

Query: 115 TAPDLVCRVVRYLQVVLLYASTYVLVSLSIDRYHAIYVPMKFLQGEKQARVLIVIA-WSL 173
PDL+CR V+YLQV+ ++ASTY+L++++DRY A+ +P++ LQ Q+ L++ A W L
Sbjct: 101 QGPDLLCRAVKYLQVLSMFASTYMILLAMTLDRYLAUNCHPLRSLQQPGQSTYLLIAAPWLL 160

Query: 174 SFLFSIPTLIIFGKRTL--SNGEVQCWALWPDDSY-WTP--YMTIVAFLVYFIPLTIISI 228
+ +FS+P + IF R + +G + CWA D + W P Y+T ++ +P+T++
Sbjct: 161 AAIFSLPQVFIFSLREVIQGSGVLDCA---DFGFPGPRAYLTWTTLAIFVLPVTMLTA 217

Query: 229 MYGIVIRTIW--IKSKT 243
Y ++ I +K KT
Sbjct: 218 CYSLICHEICKNLKVKT 234

Score = 131 (46.1 bits), Expect = 3.7e-41, Sum P(2) = 3.7e-41
Identities = 33/80 (41%), Positives = 47/80 (58%)

Query: 258 SSYNRGLISKAKIKAIKYSIIILAFICCWSFYF---LFDILDNFNLLPDTQERFYASVI 314
SS N IS+AKI+ +K + +I+LA+I CW+P+F ++ +D N PD A I
Sbjct: 267 SSINT--ISRAKIRTVKMTFVIVLAYIACWAPFFSVQMNSVWDK-NA-PDEDSTNVAFTI 322

Query: 315 IQNLPALNSAINPLIYCVFSSSI 337
L LNS NP IY F+S +
Sbjct: 323 SMLLGNLNNSCCNPWIYMGFNSHL 345

2 / 3 4

図 2

>sp|P31388|5H6 RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)
(ST-B17).
Length = 436

Score = 224 (78.9 bits), Expect = 6.7e-17, P = 6.7e-17
Identities = 84/309 (27%), Positives = 144/309 (46%)

| | |
|--------|---|
| Query: | 3 PGEA--LLAGLLVMVLAVALLSNALVLLCCAYSaelRTRASGVLLVNLSLGHLLAALDM 60 |
| | PG + + A L V++ A ++ L++L C A LR S LV+L L++ + M |
| Sbjct: | 23 PGGSGWAAALCVVIVLAAANSLLIVLICTQPA-LRN-TSNFFLVSLLFTSDLMVGTVMM 80 |
| Query: | 61 PFTLLGVMRGRTPSAPGACQVIGFLDTFLASNAALSAALSADQWLAVGFPLRYAGRRLR- 119 |
| | P +L + GR A G C + D S + L++ +S D++L + PLRY R+ |
| Sbjct: | 81 PPAMLNALYGRWVLARGLCLLWTAFDVMCCSASILNLCLISLDYLLILSPLRYKLRMTA 140 |
| Query: | 120 PRYAGLLLGCAGQSLAFSGAALGCSWLGYSSAFASCSDLRLPPEPERPRFAA---FTATL 176 |
| | PR L+LG AW SLA AL S+L + P P + R A F |
| Sbjct: | 141 PRALALILG-AW--SLA---ALA-SFLPLLLGWELGKARTPAPGQCRLLASLPFVLVA 192 |
| Query: | 177 HAVGFVLPLAVLC LTSLQVHRVARRHCQRMDTVT-----MKA L ALLADLHPSVR---- 225 |
| | V F LP +C T ++ AR+ ++ ++T ++ L + P + |
| Sbjct: | 193 SGVTFFLPSGAICFTYCRILLAARKQAVQVASLTGTAGQALETLQVPRTPRPGMESADS 252 |
| Query: | 226 QRCLIQQQKRRRHTRKIGIAIATFLICFAPYVMTRLAEVLPFVTVNAQWGILSKCLTYS 285 |
| | +R + R+ +A+ +GI + F + + P+ + +A+ V + +L+ L Y |
| Sbjct: | 253 RRLATKHSRKALKASLTGILLGMFFVTWLPFFVANIAQAVCDCISPGLFDVLT-WLGYC 311 |
| Query: | 286 KAVADPFTYSLLRRPFRQVL 305 |
| | + +P Y L R F++ L |
| Sbjct: | 312 NSTMNPIIYPLFMRDFKRAL 331 |

3 / 34

図3

>sp|P56479|GALR_MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).
Length = 348

Score = 269 (94.7 bits), Expect = 7.9e-24, P = 7.9e-24
Identities = 82/289 (28%), Positives = 136/289 (47%)

Query: 49 VGFVGNLCVIGILLHNNAKGKP-SMIHSLILNLSLADLSLLLFSAPIRATAYSKVWDLG 107
+G +GN VI +L + GKP S + ILNLS+ADL+ LLF P +AT Y+ W LG
Sbjct: 46 MGVLGNSLVITVLARSK-PGKPRSTTNLFILNLSIADLAYLLFCIPFQATVYALPTWLG 104

Query: 108 WFVCKSSDWFIHTCMAAKSLTIVVVA--KVCFCMYASDPAKQVSIHNYTIWSVLVAIWVTA 165
F+CK +F M T+ ++ + + S + + + + V IW ++
Sbjct: 105 AFICKFIHYFFTWSMLVSIFTLAAMSVDRYVAIVHSRRSSLRVSRNALLGVGF-IWALS 163

Query: 166 SLLPLPEWFFSTIRHHEGVE-MCLVDVPAVAEEFMSMFGKLYPL--LAFG--LPLFFASF 220
+ P + + H + + C P + K Y + FG LPL F
Sbjct: 164 IAMASPVAYHQRLFHRSNQTCWEQWPN-----KLHKKAYVVCTVFGYLLPLLLICF 217

Query: 221 YFWRAYDQCKKRGTKTQNLRNQIRSKQVTVMLLSIAIIISAVLWLPEWVAWLWWWHLKAAG 280
+ + + K+ K + ++ K+ +L + ++ + WLP V LW A
Sbjct: 218 CYAKVLNHLHKK-LKNMSKKSEASKKTAQTVLVVVVFGISWLPHVVHLWAEF--GAF 274

Query: 281 PAPPQGFI--ALSQVLMFSISSANPLIFLVMSEEFREGLKGWVKWMITKKPPTVSESQE 337
P P F + L +S SS NP+I+ +SE FR+ K V+K + + P SE++E
Sbjct: 275 PLTPASFFFRTAHCLAYNSNVPIIYAFLENSFRKAYKQVFKCHVCDESPR-SETKE 332

4 / 34

☒ 4

>sp:NY2R_BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY2-R).
Length = 384

Score = 153 bits (383), Expect = 5e-37
Identities = 93/308 (30%), Positives = 164/308 (53%), Gaps = 7/308 (2%)

Query: 47 DEDEDVTNSRTFFAAKIVIGMALVGIMLVCIGNFIFIAALVRYKKLRNLTNLLIANLAI 106
D + ++ +S + +V+ +A I+L+ IGN + I + + +K +R +TN IANLA+
Sbjct: 38 DSEPELIDSTKLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVIKFMSMRTVTNFFIANLAV 97

Query: 107 SDFLVAIVCCPFEMDYYVVRQLSWEHGVLCSTVNYLRTVSLYVSTNALLAIAIDRYLAI 166
+D LV +C PF + Y ++ + W+ G VLC V Y + + + VST L IA+DR+ I
Sbjct: 98 ADLLVNTLCLPFTLTYTLMG--WKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCI 155

Query: 167 VHPLRPRMKCQTATGLIALWTVSILIAIPSAYFTTETVLVIVKSQEKFICGQIWVVDQQ 226
V+ L ++ Q + +I L W VS L+A P A F + + + I+ E + C + WP + + +
Sbjct: 156 VYHLESKISKQISFLIIGLAWGSALLASPLAIFREYSLIEIIIPDFEIVACTEKWPGEK 215

Query: 227 -LYYKSYFLFIFGIEFVGPVVTMTLCYARISRELWFKA VPGFQTEQIRKRLRCRRKTVL 285
+Y Y L I +V P+ ++ Y RI +L PG + +R R+KT +
Sbjct: 216 GIYGTIYSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAHDHYHQR--RQKTTKM 272

Query: 286 LMCILTAYVLCWAPFYGFTIVRDFFPTVFVKEHYLTAFYIVECIAMSNSMINTLCFVT 345
L+C++ + + W P + F + D V + K Y F + IAM ++ N L + +
Sbjct: 273 LVCVVVVFAVSWLPLHAFQLAVOIDSHV-LDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWM 331

Query: 346 KNDTVKYF 353
++ K F
Sbjct: 332 NSNYRKAF 339

5 / 3 4

図 5

>sp|P97926|OXYR_MOUSE OXYTOCIN RECEPTOR (OT-R).
Length = 388

Score = 164 (57.7 bits), Expect = 8.9e-22, Sum P(2) = 8.9e-22
Identities = 57/166 (34%), Positives = 84/166 (50%)

| | |
|---|---|
| Query: | 24 WGLNLTLGQQGAP-----ASGPPSR-----RVRLVFLGVILVVAVAGNTTVLCRLCGGG 71 |
| | W + L LG G P +GPP R RV + L +IL +A++GN VL L |
| Sbjct: | 9 WSIELDLGSGVPPGAEGNLTAGPPRRNEALARVEAVLCLILFLALSGNACVLLAL--- 64 |
| Query: | 72 GPWAGPKRRKMDFLVQLALADLYACGGTALSQALAWELLGEPRAATGDLACRFLQLLQAS 131 |
| | K ++ F + L++ADL L QL W++ R DL CR ++ LQ |
| Sbjct: | 65 -RTTRHKHSRLFFFMKHLASIADLVVAVFQVLQPQLLWDITF--RFYGPDLLCRLVKYLQVV 121 |
| Query: | 132 GRGASAHLVVVIALERRRAVRLPHGRPLPARA--LAALG-WLLALLLALPPAFV 182 |
| | G AS +L++L++L+R A+ P. R L R LA L WL L+ ++P + |
| Sbjct: | 122 GMFASTYLLLLMSLDRCLAICQPL-RSLRRRTDRLAVLATWLGCIVASVPQVHI 174 |
| Score = 155 (54.6 bits), Expect = 8.9e-22, Sum P(2) = 8.9e-22 | |
| Identities = 49/161 (30%), Positives = 85/161 (52%) | |
| Query: | 217 CHGIFAPLPRWHLQVYAFYEAVAGFVAPVTVLGVACGHLLS--VWW--RHRPQAPAAAAP 272 |
| | C +F + W + Y + +A ++ PV VL AC L+S +W R + A AAAA |
| Sbjct: | 187 CWAVF--IQPWGPKAYVTWITLAVYIVPVIVLA-ACYGLISFKIWQNRLKTAFFFFFFAE 243 |
| Query: | 273 WSASPG-----RAPAPSALPRAKVQSLKMSLLLALLFVGCELPYFAARLAAWS-SG 323 |
| | S + G R + + +AK++++KM+ ++ L F+C P+F ++ + W + |
| Sbjct: | 244 GSDAAGGAGRAALARVSSVKLISKAKIRTVKMFTIIVLAFIVCWTPFFFVQMWSVWDVNA 303 |
| Query: | 324 PAGDWEGEGLSAALRVVAMANSALNPFYLFQAGDCRLRRQLRKRLGSLCCA 376 |
| | P E A+ ++A NS NP++Y+ F L +L +R LCC+ |
| Sbjct: | 304 PK---EASAFIIAM-LLASLNNSCCNPWIYMLFTG---HLFHELVQRF--LCCS 347 |

6 / 34

図 6

>sp|Q91178|GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (FRAGMENT).
Length = 428

Score = 823 (289.7 bits), Expect = 9.8e-83, P = 9.8e-83
Identities = 182/422 (43%), Positives = 266/422 (63%)

| | |
|--------|---|
| Query: | 2 ESSPIPQSSGNSSTLGRVPQTGPSTASGVPEVGL---RDVASESVALFFMLLLDTAV 57 |
| | ++SP+ S + S P P+ P+VG+ + + LF M+ L+L A+ |
| Sbjct: | 5 KTSPMITSDHSISNFSTGLFGPHPTVP---PDVGVVVTSSQSQMKDLFGLFCMVTLNLI AL 61 |
| Query: | 58 AGNAAVMAVIAKTPALRKFVFVFLCLVDLLAALTLMPLAMLSSSAFDHALFGEVACRL 117 |
| | N VM IA+ P L+KF FV HLC VD+L A+ LMPL ++SSS F +F + C++ |
| Sbjct: | 62 LANTGVMVAIARAPHLKKFAFVCHLCADVLCAILMPLGIISSSPFFGTVVFTILECQV 121 |
| Query: | 118 YLFLSVCFVSLAILSVAINVVERYYYVHPMRYEVRTLGLVASVLGVWVKALAMASVP 177 |
| | Y+FL+V + L+IL++AI+VERY+Y+VHPMRYEV+MT+ LV V++ +W K+L +A V |
| Sbjct: | 122 YIFLNVFLIWL SILTITAISVERYFYIVHPMRYEVKMTINLVIGVMLLIWFKSLLLALVT 181 |
| Query: | 178 VLGRVSWEEGAPSVPVPGCSLQWSHSAYCQLFVVVFVLYFLLPLLLILVVYCSMFRVARV 237 |
| | + G + + CSL SHS +F V+F V+ FL P++I VY ++++VAR |
| Sbjct: | 182 LFGWPPYGHQSSIAASHCSLHASHSRLRGVFAVLFCVICFLAPVVVIFS VSAVYKARS 241 |
| Query: | 238 AAMQHGP-LPTWME-TP-RQRSESLSSRSTMVTSSGAPQT-TPHRTFGGGKA AVVLLAVG 293 |
| | AA+Q P +PTW + +P + RS+S++S++T++T+ PQ +P R F GGKAA+ L + |
| Sbjct: | 242 AALQQVPAVPTWADASPAKDRSDSINSQTTIITRTLPQRLSPERA FSGGKA ALTLAFIV 301 |
| Query: | 294 GQFLLCWL PYFSFHLYVALSAQPISTGQVESVVTWIGYFCFTSNPFFYGC LN RQIR GELS 353 |
| | GQFL+CWL P+F FHL ++L+ S G +E V W+ Y F NP FYG LNRQIR EL |
| Sbjct: | 302 GQFLVCWL PFFI FH LQMSLTGSMKSPGDLEEAVNWLAYSSFAVNPSFYGL LNRQIR DELV 361 |
| Query: | 354 K-QFVCFKPAPEEEELRLPSREGSIEENFLQFLQGTGCPSEWVSRPLPSPKQ-EPPAVD 411 |
| | K + C +P E+ S EGS +ENFLQF+Q T SE+ S +P+ E A |
| Sbjct: | 362 KFRRCCVTQPV---EIGPSSLEGSFQENFLQFIQRTSSSETPSFANSNPRNMENQA-- 416 |
| Query: | 412 FRIPGQIAEE 421 |
| | +IPGQI EE |
| Sbjct: | 417 HKIPGQIPEE 426 |

7 / 34

図 7

| | |
|---|---|
| >sp P23749 RTA_RAT PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA. | |
| Length = 343 | |
| Score = 461 (162.3 bits), Expect = 2.3e-44, P = 2.3e-44 | |
| Identities = 121/323 (37%), Positives = 178/323 (55%) | |
| Query: | 2 NQTLNSSGTVESALNSRGS-TVHT-AYL----VLSSLAMFTCLCGMAGNSMVIWLLGFR 55 |
| | NQ G E+ YSRG T+ A L V + + + CLCG+ GN +V+W GF |
| Sbjct: | 13 NQNKMCPGMSEALELYSRGFLTIEQIATLPPPAVTNYIFLLLCLCGLVGNGLVLWFFGFS 72 |
| Query: | 56 MHRNPFCIYILNLAAADLLFLFSMASTLSLETQPLVNT-TDKVHELMKRLMYFAYTVGLS 114 |
| | + R PF IY L+LA+AD ++LFS A L + + D V + + + + G+S |
| Sbjct: | 73 IKRTPFSIYFLHLASADGIYLFSAVIALLNMGTFLGSPDYVRRVSRIVGLCTFFAGVS 132 |
| Query: | 115 LLTAISTQRCLSVLFPIWFKCHRPRHLSAWVCGLLWTLCLLMNGLTSSFCSKFL--KFNE 172 |
| | LL AIS +RC+SV+FP+W+ RP+ LSA VC LLW L L+ + + FC FL + + |
| Sbjct: | 133 LLPAISIERCVSVIFPMWYWRRRPKRLSAGVCALLWLLSFLVTSIHNYFCM-FLGHEASG 191 |
| Query: | 173 DRCFRVDMVQAALIMGVLTPTVMTLSSLTLFWVVRSSQQWRRQPTRLFVVVLASVLVFLI 232 |
| | C +D+ L+ + P+M L L L + V + + + R++ +L VVLA V VFL+ |
| Sbjct: | 192 TACLNMDISLGILLFFLFCPLMVLPCALALILHVECRARR-RQRSAKLNHVVLAIHSVFLV 250 |
| Query: | 233 CSLPLSIYWFVLYWL-SLPPEMQVLCFSLSRLSSSVSSSANPVIYFLVGSRRSHRLPTRS 291 |
| | S+ L I WF L+W+ +P + + L + +SSA P+YFL G +S RL |
| Sbjct: | 251 SSIYLGIDWF-LFWVFQIPAPFPEY--VTDLCICINSSAKPIVYFLAGRDKSQRL-WEP 305 |
| Query: | 292 LGTVLQQALRE--EPELEGGETPTVGTNEM 319 |
| | L V Q+ALR+ EP TP T EM |
| Sbjct: | 306 LRVVFQRALRDGAEPGDAASSTPNTVTMEM 335 |

8 / 34

図 8

>sp|Q98907|P2Y3_CHICK P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE RECEPTOR).
Length = 328

Score = 452 (159.1 bits), Expect = 2.0e-43, P = 2.0e-43
Identities = 85/185 (45%), Positives = 116/185 (62%)

Query: 15 CQFSEKYKQVYLSLAYSIIIFILGLPLNGTVLWHFWGQTQRWSCATTYLVNLMVADLLYVL 74
C F E++KQV L L YS++F+LGLPLN V+ W K + T Y++NL +ADLLYV
Sbjct: 13 CTFHEEFKQVLLPLVSVVFLGLPLNAVIGQIWLARKALRTTIYMLNLAMADLLYVC 72

Query: 75 -LPFLIITYSLDDRWPFGELLLCKLVHFLFYINLYGSILLTCISVHQFLGVCHPLCSLPY 133
LP LI Y+ D WPFG+ CK V F FY NL+GSIL LTCISV +++G+CHPL S
Sbjct: 73 SLPLLIYNYTQKDYWPFGDFTCKFVRFQFYTNLHGSILFLTCISVQRYMGICHPLASWHK 132

Query: 134 RT-RRHAWLGTSTTVALVVLQLLPTLAFSHTDYINGQMIWYDMTSQENFDRLFAYGIVLT 192
+ ++ WL + W +V+ Q LPT F+ T + + YD++ + F YGI LT
Sbjct: 133 KKGKKLTWLVCAAWFIVIAQCLPTFVFASTGTQRNRTVCYDLSPDRSTSYPYGITLT 192

Query: 193 LSGFL 197
++GFL
Sbjct: 193 ITGFL 197

9 / 34

図 9

>sp|002824|A1AA_RABIT ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR)
 (ALPHA-1C ADRENERGIC RECEPTOR).
 Length = 466

Score = 295 (103.8 bits), Expect = 1.0e-31, Sum P(2) = 1.0e-31
 Identities = 66/215 (30%), Positives = 113/215 (52%)

Query: 8 STRESNSSHTCMPLSKMPISLAHGIIRSTVLVIFLAASFVGNIVLALVLQRKPQLLQVTN 67
 S S+SS+ P + P+++ I+ +L + +GNI++ L + L VT+
 Sbjct: 5 SGNASDSSNCTHPPA--PVNISKAILLGVLGGLILFGVLCNLVILSVACHRHLHSVTH 62

Query: 68 RFIFNLLVTDLLQISLVAPWVVATSVPLFWPLNSHFCTALVSLTHLFAFASVNTIVVSV 127
 +I NL V DLL S V P+ + +W FC ++ L AS+ ++ V+S+
 Sbjct: 63 YYIVNLAVADLLTSTLPFSAlFEILGYWAFGRVFCNIWAADVLCCTASIISLCVSI 122

Query: 128 DRYLSIIHPLSYP SKMTQR RG YLLL GTWIVAILQSTPPLYWGQAAF DERNALCSMIWG 187
 DRY+ + +PL YP+ +TQR RG L W +++ S PL+GW Q A D+ +C +
 Sbjct: 123 DRYIGVSYPLRYPTIVTQR RGL ALLCV AFSLVISV GPLFGWRQPAPDDET-ICQI--N 179

Query: 188 ASPSYTILSVSFIVIPLIVMIACYSVVFCARRQ 222
 P Y + S + +PL +++A Y V+ A+R+
 Sbjct: 180 EEPGYVLFSALGSFYVPLTIILAMYCRVYVAKRE 214

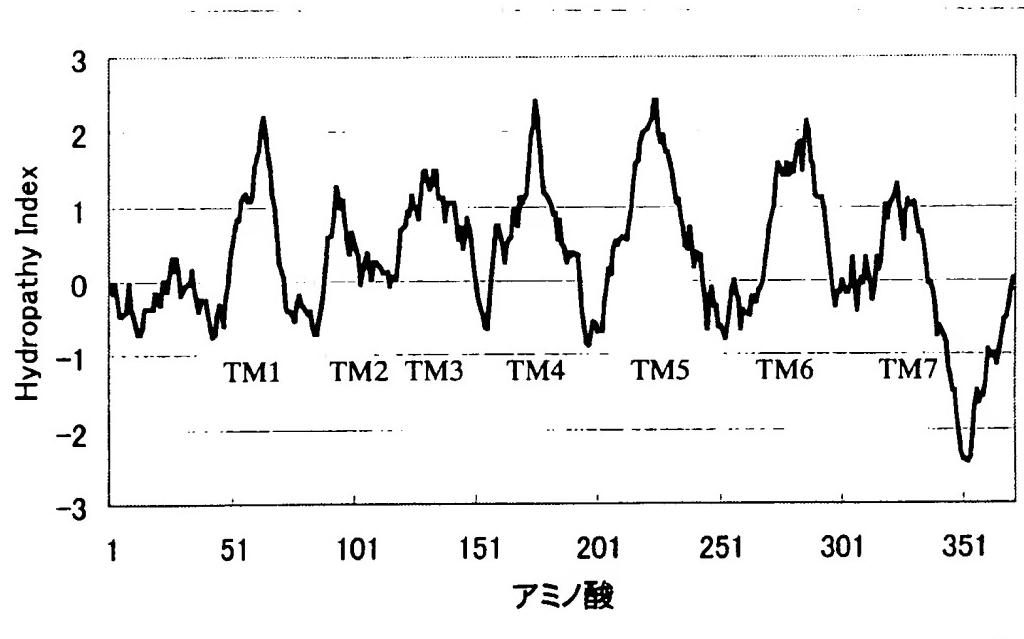
Score = 106 (37.3 bits), Expect = 1.0e-31, Sum P(2) = 1.0e-31
 Identities = 23/75 (30%), Positives = 41/75 (54%)

Query: 396 KAAKVIFI IF SYVLSLGPYCFLAVLAVWWDVETQVPQWVITIIIWLFFLQCCIH PYVYG 455
 KAAK + I++ +VL P+ + + + + + P+ V I+ WL +L C+P +Y
 Sbjct: 269 KAAKTLGIIVVGCFVLCWL PFFLVMPIGSFFP-DFKPPETVFKIVFWLG YLN S CINPIIYP 327

Query: 456 YMHKTIKKEIQDMLK 470
 + KK Q+LK
 Sbjct: 328 CSSQEFKKAFQNVLK 342

10 / 34

図 10



11 / 34

1 1

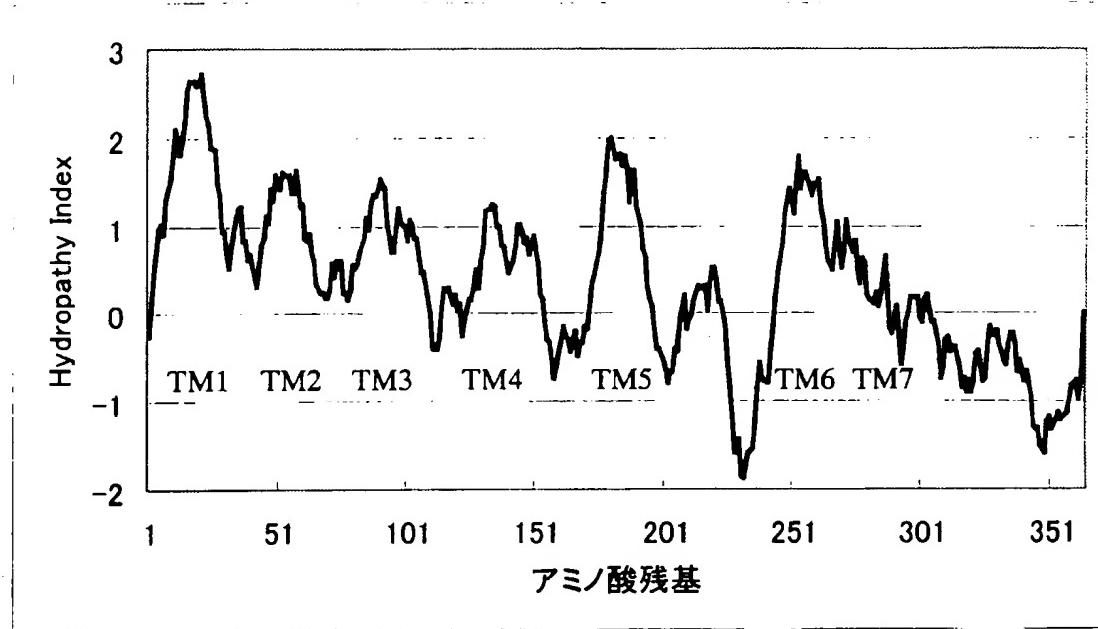
12 / 34

☒ 1 2

| | | |
|----------|---|-----------------------------|
| X64878 | FKIWQNLRLKTA.....AEAPEGAAAGDGGRVALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIVLAF | 88888888 TM6 |
| U82440 | FKIWQNLRLKTA.....AEAPEGAAAGDGGRMALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIVLAF | |
| X93313 | YKIWQNLRLKTVCESNLRRLST-----SRRATLSRVSSVRLISKAKIRTVKMTFIVLAF | |
| X87783 | FKIWQNFKRKTKKDQCITLTAA-----SKANALARVSSVKLVSKAKITTVKMTFIVLAY | |
| AF184966 | HTIWKNIKYKKRKTIPIGAAS-----KNGLIGKNSVSSVTIISRAKLRTVKMTFIVLAY | |
| X76321 | HSIWKNIKCK---TMRGTRNT-----KGDMIGKVSVSSVTIISRAKLRTVKMTLIVLAY | |
| AF147743 | KIIKRNIYVKKQNEYQVTNQ-----KQVLPSRASSVNCISKAMIKTVKMTIVTVVAY | |
| GPRv8 | RTIWIKSKTYETVISNCSDG-----KLCSYNRGLISKAKIKAIKYSIIILAF | |
| AE003754 | KTIWAKGSIFVPTERAGFA-----APARRASSRGIIIPRAKVTVKMTLTIVFVF | |
| | * | . |
| | | ..: * : : * : .. |
| | | 8888888888888888 |
| X64878 | IWCWTPFFFFVQMWSVWDANAPK---EASAFIIVMLLASLNCCNPWIYMLFTGHLFHELV | 888888888888 TM7 8888888888 |
| U82440 | IWCWTPFFFFVQMWSVWDANAPK---EASAFIIVMLLASLNCCNPWIYMLFTGHLFHELV | |
| X93313 | IWCWTPFFFFVQMWSVWDNPNNPK---EASLFIIAMLLGSLNSCCNPWIYMLFTGHLFHDLK | |
| X87783 | IWCWTPFFFFVQMWSVWDENFQYADSENTAVTISALLASLNCCNPWIYMLFFAGHLFHDLK | |
| AF184966 | IICWAPPFVTVQMWSVWDENFQYADSENTAVTISALLASLNCCNPWIYMLFSGHLQDFM | |
| X76321 | IWCWAPFFIVQMWSVWDENFSWDDSENAAVTLSALLASLNCCNPWIYMLFSGHLLYDFL | |
| AF147743 | VLCWSPFFIAQLWSVWFPSGIT---EGSAFTIIIMLLGNLNSCTNPWIYMYFCGHIPY--- | |
| GPRv8 | ICCWSPYFLFDILDNFNLLPDT-QERFYASVIQNLPALNSAINPLIYCWFSSSISFP-- | |
| AE003754 | IICWSPYIIFDLLQVFGQIPHIS-QTNIAIATFIQSLAPLNSAANPLIYCLFSSQVFRTLS | |
| | : | * ***. ** ** * . : |
| X64878 | QR-----FLCCSASYLKGRRLG--ETSASKKS-----SSSFVLSHRSSSQRSCSQPS | |
| U82440 | QR-----FLCCSASYLKGNRKG--ETSTSJKSN-----SSSFVLSHRSSSQRSCSQPS | |
| X93313 | QS-----FLCCSARYLKTQQQGS-DLSASRKS-----SSTFVLSRKSSSQKSITQPS | |
| X87783 | QS-----LLCCSTLYLKSSQCRCDQEHSRKS-----CSTYVIKSTSS-QRSITQSS | |
| AF184966 | NC-----FAWCRRANADEKKED--SDSSIRRRT-----LLTKMTM-RSPTGSTGNWRD | |
| X76321 | RC-----FPCCKKPRNMLQKED--SDSSIRRNT-----LLTKLAAGRMTNDGFGSWRD | |
| AF147743 | -----CTNKQLENTSAQ--EDSVVTGS-----IHLVD-RDPEENSTCA-- | |
| GPRv8 | -----CREQRSQDSRMT---FRERTER-----HEMQILS--KP-EF----- | |
| AE003754 | RFPPFKWFTCCCKSYRNNSQQNRCHTVGRRLHNSCDSMRTLTTSLTVSRRSTNKTNARVV | |
| | * | : |
| X64878 | TA----- | |
| U82440 | TA----- | |
| X93313 | TA----- | |
| X87783 | IT----- | |
| AF184966 | LDNSPK--TSIQME----- | |
| X76321 | PCNSRKSSQSIGLDCCFKSSQCLEHDCSRKSSQCIPLDCSRKSSQCIPLDCSRKSSQCMS | |
| AF147743 | ----- | |
| GPRv8 | ----- | |
| AE003754 | I C E R P T K V V T V P A M S E R R G V S L K G N T D I L ----- | |
| X64878 | --- | |
| U82440 | --- | |
| X93313 | --- | |
| X87783 | --- | |
| AF184966 | --- | |
| X76321 | KES | |
| AF147743 | --- | |
| GPRv8 | --- | |
| AE003754 | --- | |

13 / 34

図 13



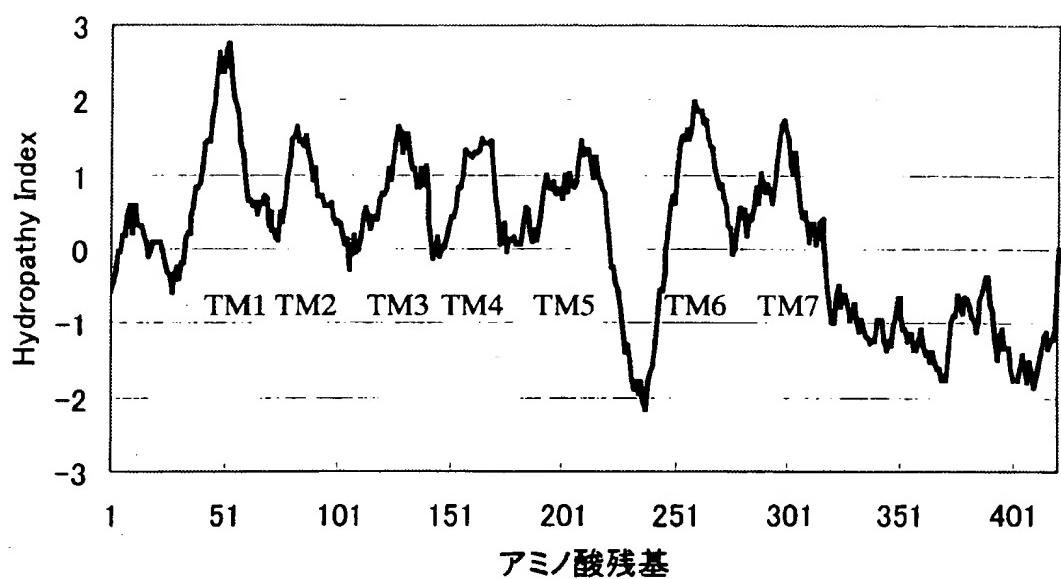
14 / 34

図 14

| | | |
|------------------------|--|--|
| GPRv12_ORF AF208288 | ***** TM1 ***** MGPGEALLAGLLVMVLAVALLSNALVLLCCAYSAELRTRASGVLLVNLSLGHLLAALDM MNSWDAGLAGLLVGTIGVSLLSNGLVLLCLLHSADIRRQAPALFTLNLCGNLLCTVVNM *.. :* ***** . . :****. **** : * :* :* . :* :* :* :* :* :* :* : | ***** TM2 *** ***** TM3 ***** ***** TM4 ***** ***** TM5 ***** ***** TM6 ***** ***** TM7 ***** |
| GPRv12_ORF AF208288 | PFTLLGVMRGRTPSAPGACQVIGFLDTFLASNAALSAALSADQWLAVGFLRYAGRRLP PLTLAGVVAQRQPAGDRLCRLAFLDTFLAANMSMSAALSIDRWYAVVFPLSYRAKMRL *:*** * : * * : . * : . ****: * : * :**** * :* :* :* :* :* :* : | |
| GPRv12_ORF AF208288 | RYAGLLLGCAGQSLAFSGAACLGCSWLGYSASFASCSLRLPPEPERPRFAFTATLHAVG RDAAFMVAYTWLHALTFPATLALSWLGFHQLYASCTLCSRDPERLRFAVFTSAFHALS *: . : . : * : . :* : . :* : . :* : . :* : . :* : . :* : . :* : . :* : | |
| GPRv12_ORF AF208288 | FVLPLAVLCLTSQVHRRVARRHCQRMDTVTMKALALLADLHPSVRQRCLIQQKRRRHAT FLLSFIVLCFTYLKVLKVARFHCKRIDVITMQTLVLLVDIHPSPRERCLEEQKRRQRAT *: . : * : | ** |
| GPRv12_ORF AF208288 | RKIGIAIAFLICFAPYVMTRLAELVPFTVNAQWGILSKCLTYSKAVADPFTYSLLRP KKISTFIGTFLVCFAPYVITRLVELFSTAPIDSHWGVLSKCLAYSKAASDPFVYSLRHQ :*. : . :* : | |
| GPRv12_ORF AF208288 | FRQVLAGMVHRLLKRTPRPASTHDSSLDVAGMVHQLLKRTPRPASTHNGSVDTENDSCLQ YRRSCKELLNRIFNRR---SIHSVGLTDHSQNILPVSE----- *: . : :* : | |
| GPRv12_ORF AF208288 | QTH --- | |

15 / 34

図15



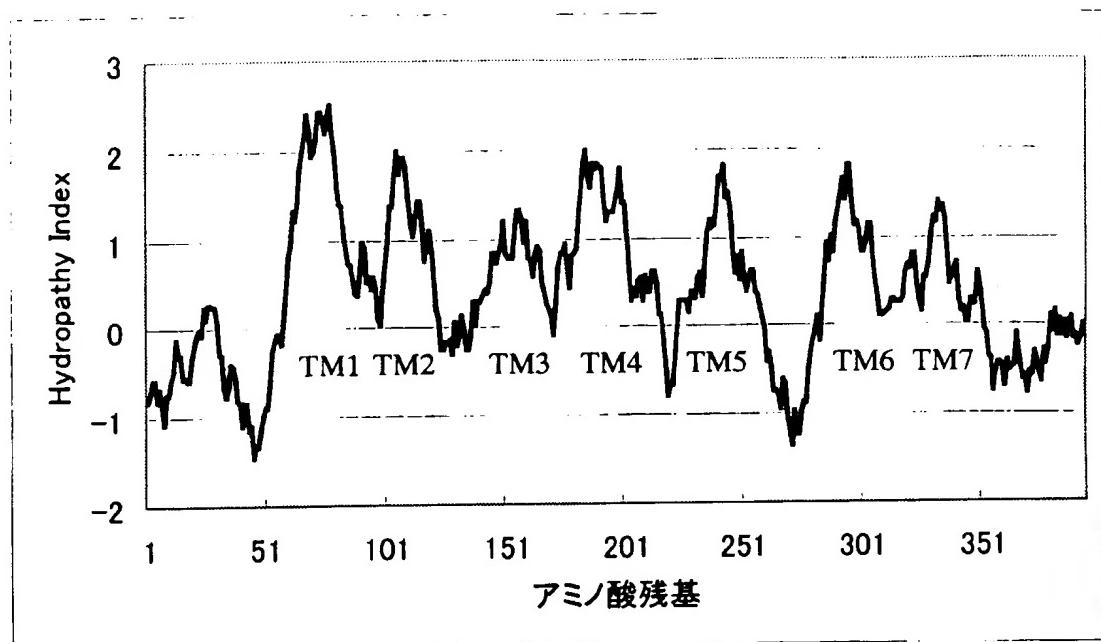
16 / 34

図 16

| | | |
|-----|--|---------------------------|
| | | ***** |
| | | ***** TM1 ***** |
| 1 | MLAAAFADSN SSSMNVSFAH LHFAGGYLPS DSQDWRTIIP ALLVAVCLVG FVGNLCVIGI 60 | |
| | | ***** |
| | | ***** TM2 ***** |
| 61 | LLHNNAWKGP SMIHSILNL SLADLSLLF SAPIRATAYS KSVWDLGWFV CKSSDWFIHT 120 | |
| | | ***** |
| | | ***** TM3 ***** TM4 ***** |
| 121 | CMAAKSLTIV VVAKVCFMYA SDPAKQVSIH NYTIWSVLVA IWTVASLLPL PEWFFSTIRH 180 | |
| | | ***** |
| | | ***** TM5 ***** |
| 181 | HEGVEMCLVD VPAVAEEFMS MFGKLYPLLA FGLPLFFASF YFWRAYDQCK KRGTKTQQLR 240 | |
| | | ***** |
| | | ***** TM6 ***** TM7 ***** |
| 241 | NQIRSKQVTV MLLSIAIIASA VLWLPEWVAW LWVWHLKAAG PAPPQGFIAL SQVLMFSISS 300 | |
| | | ***** |
| | | ***** |
| 301 | ANPLIFLVMS EEFREGLKGV WKWMITKKPP TVSESQETPA GNSEGLPDKV PSPESPASIP 360 | |
| | | ***** |
| 361 | EKEKPSSPSS GKCKTEKAEI PILPDVEQFW HERDTVPSVQ DNDPIPWEHE DQETGEGVK 419 | |

17 / 34

図 17



18 / 34

四 18

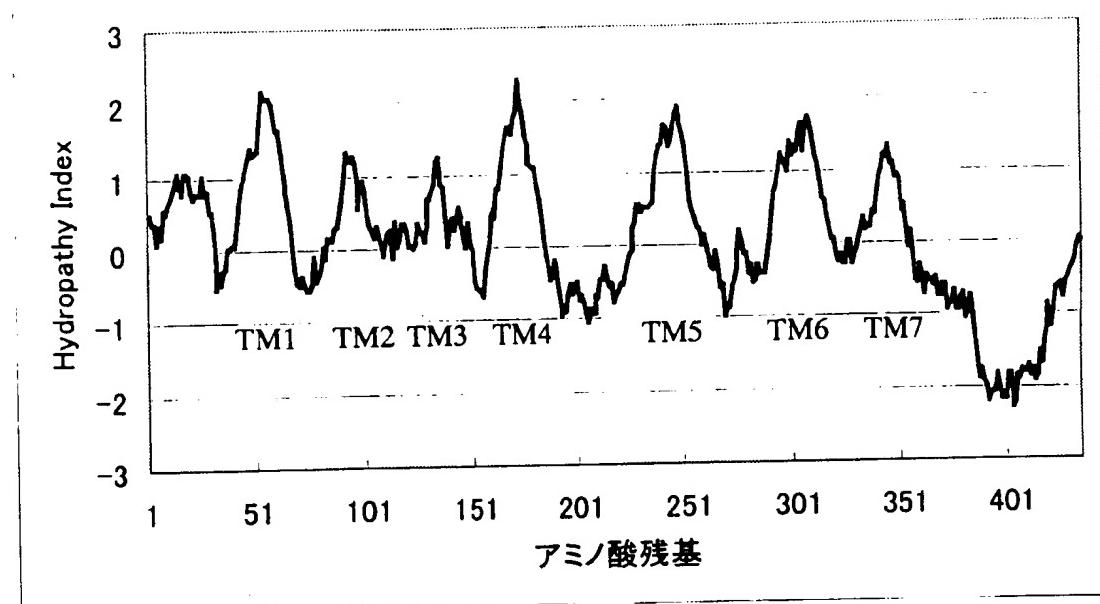
19 / 34

义 19

| | | |
|--|---|-----------------|
| GPRv21 AL121755 AF236082 U42766 U76254 U42389 U50144 D86238 M81490 AF037444 | TVLVIVKSQ--EKIFCGQIWPVDQQ-LYYKSYFLFIGIEFVGPVVTMLCYARI\$RELW TVLFIVKSQ--EKIFCGQIWPVDQQ-LYYKSYFLFIGVEFVGPVVTMLCYARI\$RELW TVLV1VERQ--EKIFCGQIWPVDQQ-FYYRSYFLLVFGLEFVGPVVA\$TLCYARV\$RELW SLIEIIPDF--EIVACTEKWPGEEEKS YGTVYSLSSLL LYVLPLG ISFSYTRIWSKLK SLIEIIPDF--EIVACTEKWPGEEEKS YGTVYSLSSLL LYVLPLG ISFSYTRIWSKLK SLIEIIPDF--EIVPCTEKWPAAEKS YGTVYSLSSLL LYVLPLG ISFSYTRIWSKLK SLIEIIPDF--EIVACTEKWPGEEKGIYGT YSLSSLL LYVLPLG ISFSYTRIWSKLK SLIEIIPDF--EIVACTEKWPGEEEKSVYGTVYSLSTLL LYVLPLG ISFSYTRIWSKLK DIPMSPWHTKCEKYICREMWPSRSQ---EYYYTLSDLALQFVVPLGVIFTYARITIRVW TKQSNSTGL-----CLEHFENDHN---RYIYSIVIMMLQYFVPLAVITVTNTHIGYIVW *: : : * : : . *: : . :: : : | ***** TM5 ***** |
| GPRv21 AL121755 AF236082 U42766 U76254 U42389 U50144 D86238 M81490 AF037444 | FKAVPG-FQTEQIRKRLRCRRKTVLVLNC LTAYVLCWAPFYGFT VRDFFPTVFVKEKH FKAVPG-FQTEQIRKRLRCRRKTVLVLNC LTAYVLCWAPFYGFT VRDFFPTVFVKEKH FKAVPG-FQTEQIRRTVCRRTVGLVCVLSAYVLCWAPFYGFT VRDFFPSVFVKEKH NHVSPG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVVFAWSWPLHAFQLAVD-IDSQVLDLKE SHVSPG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVVFAWSWPLHAFQLAVD-IDSQVLDLKE NHVSPG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVVFAWSWPLHAFQLAVD-IDSQVLDLKE NHVSPG-AAHDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVVFAWSWPLHAFQLAVD-IDSHVLDLKE NHVSPG-AASDHYHQR---RHKMTKMLVCVVVVFAWSWPLHAFQLAVD-IDSHVLDLKE AKRPPGEAETNRDQRMRASKRMVKMLTVVIVFTCCWLPFNILQLLLN--DEEFAHWDP IKKTPGEAEEDRDRMAASKRRLVKMIIIVVVIYAVCWLWVHVITLVGD-HNPDIYNQPH : ** : : : : : : : : : : : : : : : : : : | ***** TM6 ***** |
| GPRv21 AL121755 AF236082 U42766 U76254 U42389 U50144 D86238 M81490 AF037444 | YLTAFYI\$ECIAMNSNMINTLCFVTVKNDTVKYFKKIML-----LHWKASYNGGKS YLTAFYV\$ECIAMNSNMINTVCFVTVKNNTMKYFKKMMI-----LHW\$RPSQRGSKS YLTAFYV\$ECIAMNSNMINTLCFVTVRNNTSKYLKRILR-----LQWRASP\$GSKA YKLIFTVFHIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQR\$DAIHSEV YKLIFTVFHIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQR\$DAIHSEV YKLIFTVFHIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQR\$DAIHSEV YKLIFTVFHIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQR\$DAIHSEV YKLIFTVFHIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQR\$DAIHSEV LPYVWFAFH\$WLA\$HSCCYNP IYCYNM\$ARFRSGFVQLMHRMPGLRRWCLRSVGDRMNAT MN\$VWLC\$AQWLAMSH\$CYNP\$VYFSLSATFRRNLRRMTHACRLKQKR-LRQHLS\$WRS\$RA : :**. *.. : : : : : : : : : : : : : | ***** TM7 ***** |
| GPRv21 AL121755 AF236082 U42766 U76254 U42389 U50144 D86238 M81490 AF037444 | S-----ADLDLKTIGM--PATEEVDCIRLK-- S-----ADLDLRTNGV--PTTEEVDCIRLK-- S-----ADLDLRTTG ----PATEEVDCIRLK-- SVTFKAK----KNLEV\$RKNSG--PNDSFTEATNV-- SVTFKAK----KNLEV\$RKNSG--PNDSFTEATNV-- SVTFKAK----KNLEV\$RKNSG--PNDSFTEATNV-- SVTFKAK----KHLQVTKNNNG--PNDSFTEATTNV-- SMTFKAK----KNLEV\$KKNNNG--PTDSFSEATNV-- SGTGPALPLN--RMNTSTTYI\$ARRKPRATSLRANPL\$CGET\$PLR-- DAWDRDTEVYGSAESIPS\$KVSA\$GLHSSN\$RGAKHVNT\$SGEWQCLKEKKLKGVSNDWYL | |

20 / 34

図20



21 / 34

図 21

**
***** TM1 **
1 MEDLFSPSIL PPAPNISVPI LLGWGLNLTL QQGAPASGPP SRRVRLVFLG VILVVAVAGN 60

**** TM2 ****
61 TTVLCRLCGG GGPWAGPKRR KMDFLLVQLA LADLYACGGT ALSQLAWELL GEpraATGDL 120

@ TM3 @ TM4 ***
121 ACRFLQLLQA SGRGASAHLV VLIALERRRA VRLPHGRPLP ARALALA GL LALLLA PPA 180

*

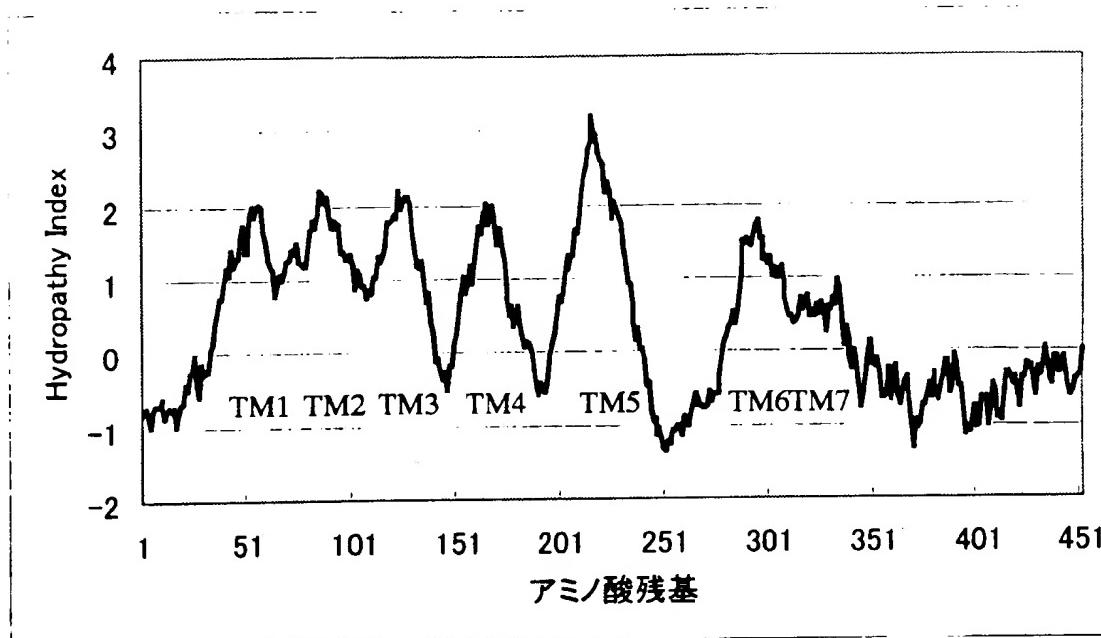
*** @ TM5 ***
181 FVVRGDSPSP LPPPPPPTSL QPGAPPAARA WPGQRRCHGI FAPLPRWHLQ VYAFYEAVAG 240

241 FVAPVTVLGV ACGHLLSVWW RHRPQAPAAA APWSASPGRA PAPSALPRAK VQSLKMSLLL 300

* TM6 * TM7 ***
301 ALLFVGCELP YFAARLAAAW SSGPAGDWEG EGLSAALRVV AMANSALNPV VYLFFQAGDC 360
361 RLRRQLRKRL GSLCCAPQGG AEDEEGPRGH QALYRQRWPH PHYHHARREP LDEGGLRPPP 420
421 PRPRPLPCSC ESAF

22 / 34

図 2.2



23 / 34

図 23

24 / 34

四 24

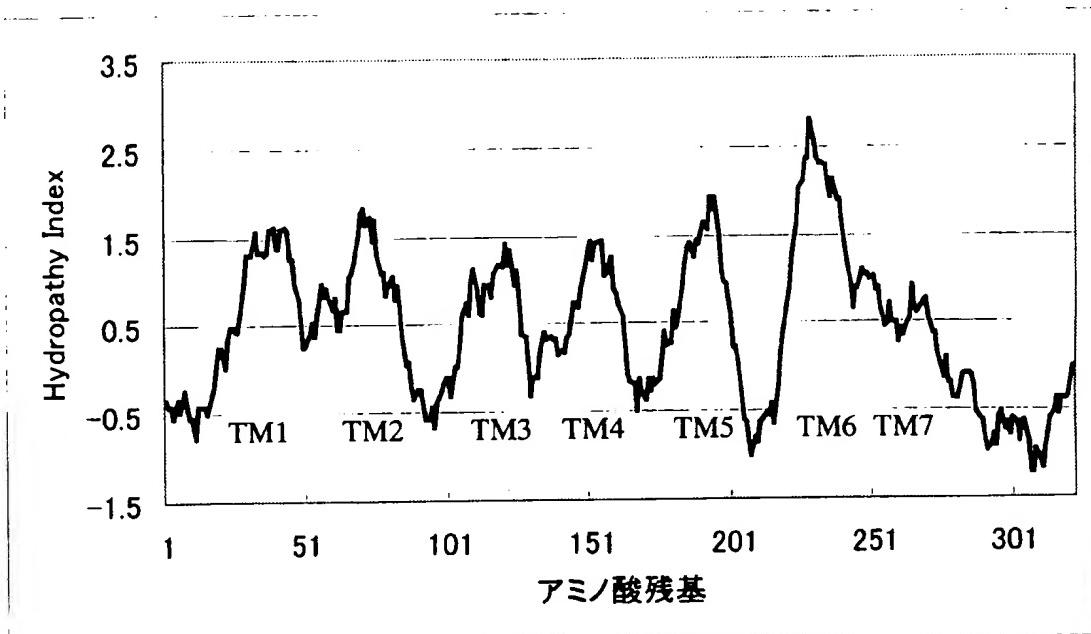
25 / 34

☒ 25

| | |
|---------|---|
| HSH2R_1 | QEEKPLKLQVWSGTEVT----- |
| D49783 | QEEKPLKLQVWSGTEVTAPQGATDR----- |
| M32701 | QEEKPLKLQVWSGTEVTAPRGATDR----- |
| U25440 | QEDKPLNLQVWSGTEVTAPQGATNR----- |
| S57565 | QEEKPLKLQVWSGTELTHPQGNPIR----- |
| S73473 | QNS-PLNR--FDGYEGERP-FPT----- |
| M74716 | QNS-PLNR--FDGYEGERP-FPT----- |
| U64032 | SAGAALPGAALALTAAPAPSSAAPEGQAAGAGRRKPPCAFREWRLLGPLRRPTTQLRAK |
| L41147 | QQVLPLPLPPDSDSDSDAGSGGSSGLRLTAQLLPGEATQDPPLPTRAAAAVNFFNIDPA |
| GPRv47 | LQGTGCPSESWSRPLPSPKQEPPAVDFRIPGQIAEETSEFLEQQLTSDDIMSDSYLRPA |
| D43633 | IQRRTSSSSETHPSFANSNP-RNMENQAHKIPGQIPEEQA----- |
| HSH2R_1 | ----- |
| D49783 | ----- |
| M32701 | ----- |
| U25440 | ----- |
| S57565 | ----- |
| S73473 | ----- |
| M74716 | ----- |
| U64032 | VSSLSHKIRAGGAQRAAACALRSEVEAVLSVARDVAEDNTCQAYELADYRNLRETDI |
| L41147 | EPELRPHPLGIPTN----- |
| GPRv47 | ASPRLES----- |
| D43633 | ----- |

26 / 34

図26



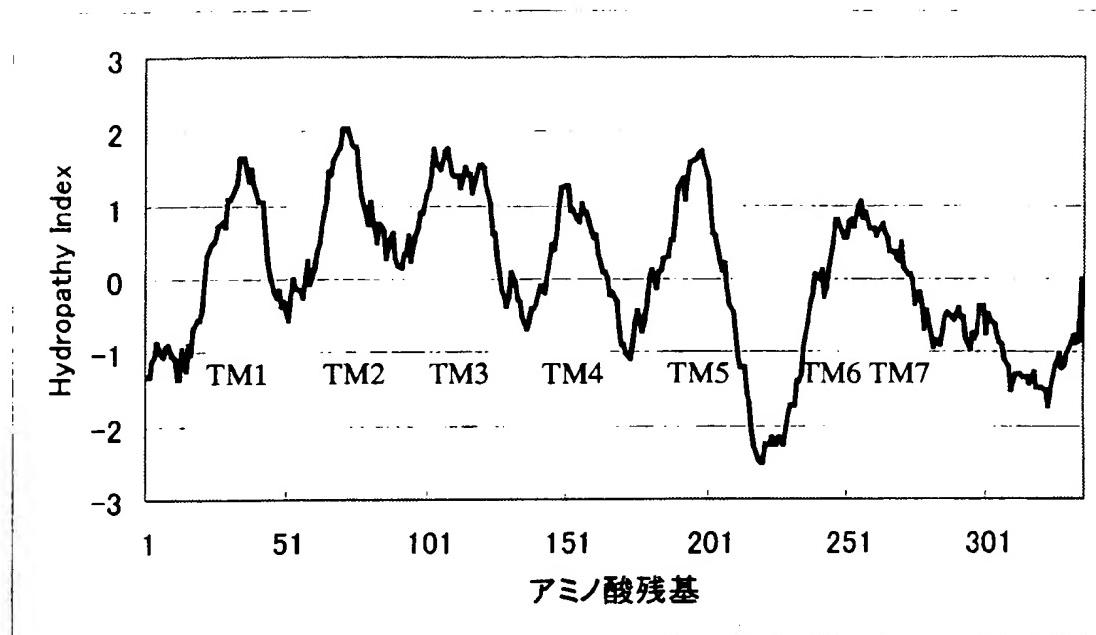
27 / 34

图 27

| | | |
|--------|--|-----------------|
| | | ***** TM1 * |
| GPRv51 | -----MNQTLNSSGTVESALNYSRGSTVHTAYVLSSLAMFTCLCGMA | |
| M35297 | MAGNCSWEAHSTNQNKMCPGMSEALELYSRGFLTIEQIATLPPAVTNYIFLLLCLCGLV **. ..* *: *** . .*. : : : ***:. | |
| | | ***** TM2 ***** |
| GPRv51 | GNSMVWLLGFRMHRNPFCIYLNLAAADLLFLFSMASTLSLETQPLVN-TTDKVHELMK | |
| M35297 | GNGLVLWFFGFSIKRTPFSYFLHLASADGIYLFSAVIALLNMGTFLGSPDYVRVRSR **. ;*:;*:;** ;:;.*.**;*:;**;*: ;:*** * *: * *: . : | |
| | | ***** TM3 ***** |
| GPRv51 | RLMYFAYTVGLSLLTAISTQRCLSVLFPWFKCHRPRHLSAWVCGLLWTLCLLMNGLTSS | ***** TM4 ***** |
| M35297 | IVGLCTFFAGVSLLPAISIERCVSVIPMWYWRRPKRLSAGVCALLWLLSFLVTSIHNY : : : .*:***.*** ;*:;**;*: ;*:;*** **.*** * .:*. . . | |
| | | ***** TM5 ***** |
| GPRv51 | FCSKFLKFNE-DRCFRVDMVQAALIMGYLTPVMTLSSLTLFVWVRRSSQQWRRQPTRLFV | |
| M35297 | FCMFLGHEASGTACLNMDISLGILLFFLFCPLMVLPCLAIIHVECRARRQRS-AKLNH ** : : . *:;*: . *:; : *:;*\$..*\$:;*: \$. : : ;*: . :* | |
| | | ***** TM6 ***** |
| GPRv51 | VVLASVLVFICSLPLSIYWFVLYWLSLPPENQVLCFSLSRLSSSVSSANPVIYFLVGS | ***** TM7 ***** |
| M35297 | VVLAIHSVFLVSSIYLGIDWFLFWFQIP---APFPEYVTDLCICINSSAKPIVYFLAGR **** * ***;*: *: * *;*: ;:;*: : :;*: . : : * . . .***;*:;***. * | |
| | | |
| GPRv51 | RRSHRLPTRSLGTVLQQALRE--EPELEGGETPTVGTNEMGA----- | |
| M35297 | DKSQRNLWEP-LRVVFQRALRDGAEPGDAASSTPNTVTMEMQCPSGNAS ;*:;* * .*:;*;***: ** ...**.. * ** . | |

28 / 34

図28



29 / 34

図29

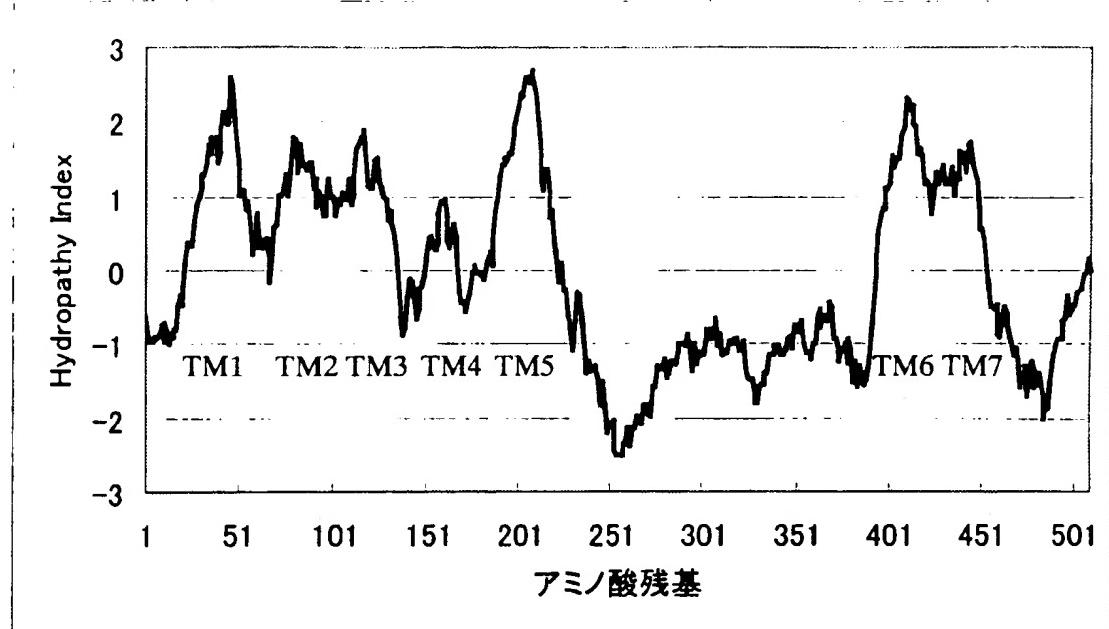
30 / 34

☒ 30

| | |
|----------|--|
| | ***** TM7 ***** |
| Y14705 | YKVTRPLASANSCLDPVLYLFTGDKYRNQLQQLCRGSK--PKPR-----TAASSL |
| AJ277752 | YKVTRPLASANSCLDPVLYLFTGDKYRNQLQQLCRGST--PKRR-----TTASSL |
| AF031897 | YKITRPLASINSCLDPILYFMAGDKYRGRLRRGAAQR---P-R-----PVPTSL |
| X99953 | YKVTRPLASANSCIDPILYFLANDRYRRRLIRTVRSSVPNRRCMHTNHPQTEPHNTAG |
| AF069555 | YKCTRPFAASMNSVLDPILFYFTQRKFRESTRYLLDKMS-----SKWRHD |
| X98283 | YKCTRPFAASMNSVLDPILFYFTQRKFRESTRYLLDKMS-----SKWRQD |
| D63665 | YKGTRPFAANSVLDPILFYFTQQKFRRQPHDLLQKLT-----AKWQRQ |
| GPRv71 | DMEASGECEQLPQPSPVLSFKGGKNVRLLQKLQRQNKLG-----EHPAGRK |
| | : \$: \$. |
| Y14705 | ALVTLHEESISRWADTHQDSTFSAYEGDRL----- |
| AJ277752 | ALVTLHEESISRWADIHQDSIFPAYEGDRL----- |
| AF031897 | LALVSPSVDSVVGSCCNSE---SRGMGTWSRGQQ----- |
| X99953 | PLPVISAEEIPSNGSMVRDENEGSREHRVETDTKEINQMMNRSTIKRNSTDKNDMKE |
| AF069555 | HCITYGS----- |
| X98283 | HCISYGS----- |
| D63665 | RV----- |
| GPRv71 | RCPGLNRSG----- |
| Y14705 | ----- |
| AJ277752 | ----- |
| AF031897 | ----- |
| X99953 | NRHGENYL PYVEVVEKEDYETKRENRTTEQSSKTNAEQDELQTQIDSRLKRGKWQLSSK |
| AF069555 | ----- |
| X98283 | ----- |
| D63665 | ----- |
| GPRv71 | ----- |
| Y14705 | ----- |
| AJ277752 | ----- |
| AF031897 | ----- |
| X99953 | KGAAQENEKGHMEPSFEGEGTSTWNLLTPKMYGKKDRDLAKNVEEVGYCKEKELOQNFPA |
| AF069555 | ----- |
| X98283 | ----- |
| D63665 | ----- |
| GPRv71 | ----- |

31 / 34

図 3.1



32 / 34

図32

33 / 34

33

34 / 34

图 34

| | | |
|----------|--|---|
| | | |
| U03866 | -PIIYPCSSQEFK---KAFQNVLRIQCLCRKQSSKH---ALGYT-LHPPSQAVERGQHK- | |
| L31774 | -PIIYPCSSQEFK---KAFQNVLRIQCLRRKQSSKH---ALGYT-LHPPSQAVERGQHK- | |
| D25235 | -PIIYPCSSQEFK---KAFQNVLRIQCLRRKQSSKH---ALGYT-LHPPSQAVERGQHK- | |
| D32202 | -PIIYPCSSQEFK---KAFQNVLRIQCLRRKQSSKH---ALGYT-LHPPSQAVERGQHK- | |
| D32201 | -PIIYPCSSQEFK---KAFQNVLRIQCLRRKQSSKH---ALGYT-LHPPSQAVERGQHK- | |
| AF013261 | -PIIYPCSSQEFK---KAFQNVLRIQCLCRKQSSKH---ALGYT-LHPPSQAVERGQHK- | |
| U81982 | -PIIYPCSSQEFK---KAFQNVLKIQCLRRKQSSKH---ALGYT-LHAPSQALEGQHK- | |
| U07126 | -PIIYPCSSQEFK---KAFQNVLRIQCLRRRQSSKH---ALGYT-LHPPSQALEGQHR- | |
| S71323 | -PIIYLCSNQEKF---KAFQSLLCVGHCLRMTPRAHHHHLSVGQSQTQGHSLTISLDKG | |
| D63859 | -PIIYLCSNQEKF---KAFQSLLGCVHCLRMTPRAHHHHLSVGQSQTQGHSLTISLDKG | |
| AF091890 | -PLIYGLWN-----KTVRKELLMCFCGDRYYREP---FVQR--QRTSRLFSISNR- | |
| GPRv72 | DOMEGEDDINFSEDDVEAVNIPESLPPSRMSNSNP---PLPRCYQCKAAKVIIFIIIFS | |
| : | : | : |
| U03866 | DMVRIPVGSRRETIFYRISKTDG--VCEWKFFSSMPRGCSRITVSKDQS--SCTTARVRSKS | |
| L31774 | DMVRIPVGSRRETIFYRISKTDG--VCEWKFFSSMPRGCSRITVSKDQS--SCTTARVRSKS | |
| D25235 | DMVRIPVGSRRETIFYRISKTDG--VCEWKFFSSMPRGCSRITVSKDQS--SCTTARVRSKS | |
| D32202 | DMVRIPVGSRRETIFYRISKTDG--VCEWKFFSSMPRGCSRITVSKDQS--SCTTARTKSRS | |
| D32201 | DMVRIPVGSRRETIFYRISKTDG--VCEWKFFSSMPRGCSRITVSKDQS--SCTTARGHTPM | |
| AF013261 | DMVRIPVGSRRETIFYRISKTDG--VCEWKFFSSMPRGCSRITVSKDQS--SCTTARRGMDC | |
| U81982 | DMVRIPVGSGETFYKISKTDG--VCEWKFFSSMPRGCSRITVPKDQS--ACTTARVRSKS | |
| U07126 | DMVRIPVGSGETFYKISKTDG--VCEWKFFSSMPOGSARITVPKDQS--ACTTARVRSKS | |
| S71323 | APCRSLSPSSVALSRTPSSRD--SREWRVFGCGPINSG--PGPTEAG--RAKVAKLCNKS | |
| D63859 | APCRSLSPSSVALSRTPSSRD--SREWRVFGCGPINSG--PGPTEAG--RAKVAKLCNKS | |
| AF091890 | -ITDGLSPHLTALMAG-----GQLGHS--SSTGDTG--FSCSQDSGN-- | |
| GPRv72 | YVLSLGPYCFLAVLAVWDVETQVPQWVITIIILFLQCCIHYPVYGYWIKTIKKEIJD | |
| : | : | : |
| U03866 | FLQVCCCVGPS-TPSLDKN--HQVPTIKVHTISLSENGEEV----- | |
| L31774 | FLQVCCCVGPS-TPSLDKN--HQVPTIKVHTISLSENGEEV----- | |
| D25235 | FLEVCCCVGPS-TPSLDKN--HQVPTIKVHTISLSENGEEV----- | |
| D32202 | VTRLECSG----MILAHCN--LRLPGSRDSPASASQAAGTTGDPVPPGRRHQQLIFYFLYT----- | |
| D32201 | RYFTKNCR--EHIKHVN--FMMPWWRKGLEC----- | |
| AF013261 | FLQVCCCVGPS-TPNPGEN--HQVPTIKIHTISLSENGEEV----- | |
| U81982 | FLQVCCCVGS-APRPEEN--HQVPTIKIHTISLSENGEEV----- | |
| U07126 | LHRTCCCILRARTPTQDPAPLGDLPТИKIHQLSLSEKGESV----- | |
| S71323 | LHRTCCCILRARTPTQDPAPLGDLPТИKIHQLSLSEKGESV----- | |
| D63859 | -LRAL----- | |
| AF091890 | MLKKFFCCEK--PPKEDSH--PDLPCTEGCTEGKIVPSYDSATFP----- | |
| GPRv72 | | |
| U03866 | ----- | |
| L31774 | ----- | |
| D25235 | ----- | |
| D32202 | ETGFHHVGQDDLDLLTS | |
| D32201 | ----- | |
| AF013261 | ----- | |
| U81982 | ----- | |
| U07126 | ----- | |
| S71323 | ----- | |
| D63859 | ----- | |
| AF091890 | ----- | |
| GPRv72 | ----- | |

1 / 6 6

SEQUENCE LISTING

<110> HELIX RESEARCH INSTITUTE

<120> Novel G protein-coupled receptors and genes encoding them,
and their production and use.

<130> H1-113DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-375152

<151> 1999-12-28

<150> JP 2000-101339

<151> 2000-03-31

<160> 63

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 371

<212> PRT

2 / 6 6

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly

1

5

10

15

Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe

20

25

30

Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe

35

40

45

Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile

50

55

60

Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys

65

70

75

80

Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe

85

90

95

Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly

100

105

110

Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln

115

120

125

3 / 6 6

Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile

130

135

140

Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu

145

150

155

160

Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu

165

170

175

Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn

180

185

190

Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr

195

200

205

Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr

210

215

220

Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys

225

230

235

240

Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu

245

250

255

Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala

4 / 6 6

260 265 270

Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser

275 280 285

Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp

290 295 300

Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala

305 310 315 320

Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser

325 330 335

Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr

340 345 350

Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro

355 360 365

Glu Phe Ile

370

<210> 2

<211> 363

5 / 6 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Pro Gly Glu Ala Leu Leu Ala Gly Leu Leu Val Met Val Leu

1

5

10

15

Ala Val Ala Leu Leu Ser Asn Ala Leu Val Leu Leu Cys Cys Ala Tyr

20

25

30

Ser Ala Glu Leu Arg Thr Arg Ala Ser Gly Val Leu Leu Val Asn Leu

35

40

45

Ser Leu Gly His Leu Leu Leu Ala Ala Leu Asp Met Pro Phe Thr Leu

50

55

60

Leu Gly Val Met Arg Gly Arg Thr Pro Ser Ala Pro Gly Ala Cys Gln

65

70

75

80

Val Ile Gly Phe Leu Asp Thr Phe Leu Ala Ser Asn Ala Ala Leu Ser

85

90

95

Val Ala Ala Leu Ser Ala Asp Gln Trp Leu Ala Val Gly Phe Pro Leu

100

105

110

Arg Tyr Ala Gly Arg Leu Arg Pro Arg Tyr Ala Gly Leu Leu Leu Gly

6 / 6 6

115 120 125

Cys Ala Trp Gly Gln Ser Leu Ala Phe Ser Gly Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Ser Trp Leu Gly Tyr Ser Ser Ala Phe Ala Ser Cys Ser Leu Arg Leu

145 150 155 160

Pro Pro Glu Pro Glu Arg Pro Arg Phe Ala Ala Phe Thr Ala Thr Leu

165 170 175

His Ala Val Gly Phe Val Leu Pro Leu Ala Val Leu Cys Leu Thr Ser

180 185 190

Leu Gln Val His Arg Val Ala Arg Arg His Cys Gln Arg Met Asp Thr

195 200 205

Val Thr Met Lys Ala Leu Ala Leu Leu Ala Asp Leu His Pro Ser Val

210 215 220

Arg Gln Arg Cys Leu Ile Gln Gln Lys Arg Arg Arg His Arg Ala Thr

225 230 235 240

Arg Lys Ile Gly Ile Ala Ile Ala Thr Phe Leu Ile Cys Phe Ala Pro

245 250 255

7 / 6 6

Tyr Val Met Thr Arg Leu Ala Glu Leu Val Pro Phe Val Thr Val Asn

260

265

270

Ala Gln Trp Gly Ile Leu Ser Lys Cys Leu Thr Tyr Ser Lys Ala Val

275

280

285

Ala Asp Pro Phe Thr Tyr Ser Leu Leu Arg Arg Pro Phe Arg Gln Val

290

295

300

Leu Ala Gly Met Val His Arg Leu Leu Lys Arg Thr Pro Arg Pro Ala

305

310

315

320

Ser Thr His Asp Ser Ser Leu Asp Val Ala Gly Met Val His Gln Leu

325

330

335

Leu Lys Arg Thr Pro Arg Pro Ala Ser Thr His Asn Gly Ser Val Asp

340

345

350

Thr Glu Asn Asp Ser Cys Leu Gln Gln Thr His

355

360

<210> 3

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo sapiens

8 / 6 6

<400> 3

Met Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Ser Asn Ser Ser Met Asn Val

1

5

10

15

Ser Phe Ala His Leu His Phe Ala Gly Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Ser

20

25

30

Gln Asp Trp Arg Thr Ile Ile Pro Ala Leu Leu Val Ala Val Cys Leu

35

40

45

Val Gly Phe Val Gly Asn Leu Cys Val Ile Gly Ile Leu Leu His Asn

50

55

60

Ala Trp Lys Gly Lys Pro Ser Met Ile His Ser Leu Ile Leu Asn Leu

65

70

75

80

Ser Leu Ala Asp Leu Ser Leu Leu Phe Ser Ala Pro Ile Arg Ala

85

90

95

Thr Ala Tyr Ser Lys Ser Val Trp Asp Leu Gly Trp Phe Val Cys Lys

100

105

110

Ser Ser Asp Trp Phe Ile His Thr Cys Met Ala Ala Lys Ser Leu Thr

115

120

125

9 / 6 6

Ile Val Val Val Ala Lys Val Cys Phe Met Tyr Ala Ser Asp Pro Ala

130 135 140

Lys Gln Val Ser Ile His Asn Tyr Thr Ile Trp Ser Val Leu Val Ala

145 150 155 160

Ile Trp Thr Val Ala Ser Leu Leu Pro Leu Pro Glu Trp Phe Phe Ser

165 170 175

Thr Ile Arg His His Glu Gly Val Glu Met Cys Leu Val Asp Val Pro

180 185 190

Ala Val Ala Glu Glu Phe Met Ser Met Phe Gly Lys Leu Tyr Pro Leu

195 200 205

Leu Ala Phe Gly Leu Pro Leu Phe Phe Ala Ser Phe Tyr Phe Trp Arg

210 215 220

Ala Tyr Asp Gln Cys Lys Lys Arg Gly Thr Lys Thr Gln Asn Leu Arg

225 230 235 240

Asn Gln Ile Arg Ser Lys Gln Val Thr Val Met Leu Leu Ser Ile Ala

245 250 255

Ile Ile Ser Ala Val Leu Trp Leu Pro Glu Trp Val Ala Trp Leu Trp

260 265 270

10 / 66

Val Trp His Leu Lys Ala Ala Gly Pro Ala Pro Pro Gln Gly Phe Ile

275 280 285

Ala Leu Ser Gln Val Leu Met Phe Ser Ile Ser Ser Ala Asn Pro Leu

290 295 300

Ile Phe Leu Val Met Ser Glu Glu Phe Arg Glu Gly Leu Lys Gly Val

305 310 315 320

Trp Lys Trp Met Ile Thr Lys Lys Pro Pro Thr Val Ser Glu Ser Gln

325 330 335

Glu Thr Pro Ala Gly Asn Ser Glu Gly Leu Pro Asp Lys Val Pro Ser

340 345 350

Pro Glu Ser Pro Ala Ser Ile Pro Glu Lys Glu Lys Pro Ser Ser Pro

355 360 365

Ser Ser Gly Lys Gly Lys Thr Glu Lys Ala Glu Ile Pro Ile Leu Pro

370 375 380

Asp Val Glu Gln Phe Trp His Glu Arg Asp Thr Val Pro Ser Val Gln

385 390 395 400

Asp Asn Asp Pro Ile Pro Trp Glu His Glu Asp Gln Glu Thr Gly Glu

11 / 66

405

410

415

Gly Val Lys

<210> 4

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser

1

5

10

15

Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser

20

25

30

Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu

35

40

45

Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val

50

55

60

Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn

65

70

75

80

12 / 66

Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
85 90 95

Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
100 105 110

Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
115 120 125

Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg
130 135 140

Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
145 150 155 160

Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
165 170 175

Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu
180 185 190

Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
195 200 205

Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp

1 3 / 6 6

210 215 220

Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu

225 230 235 240

Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser

245 250 255

Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile

260 265 270

Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys

275 280 285

Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr

290 295 300

Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr

305 310 315 320

Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met

325 330 335

Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr

340 345 350

14 / 66

Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly

355 360 365

Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr

370 375 380

Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys

385 390

<210> 5

<211> 1116

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccggca gacgctggat 60
tcttccccag tggcttgcac tgaaacagtg acttttactg aagtggtgga aggaaaggaa 120
tggggttccct tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180
gtttttacca ttgttgaaaa ctccgttgtg ctttttcca catggaggag aaagaagaag 240
tcaagaatga ccttcttgt gactcagctg gccatcacag attcttcac aggactggc 300
aacatcttga cagatattaa ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt 360
tgccgagtgg tccgctattt gcaggttgtg ctgctctacg cctctaccta cgtcctggtg 420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctaccca tgaagttcct tcaaggagaa 480
aagcaagcca gggtcctcat tgtgategcc tggagcctgt ctttctgtt ctccattccc 540
accctgatca tatttggaa gaggacactg tccaaacggtg aagtgcagtg ctggccctg 600

15 / 66

tggcctgacg actcctactg gacccatac atgaccatcg tggccttcct ggtgtacttc 660
atccctctga caatcatcg catcatgtat ggcattgtga tccgaactat ttggattaaa 720
agcaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
aaccgaggac tcatctcaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatacgat catcatcatt 840
ttgccttca tctgctgttg gagtcatac ttccctgttg acattttgga caatttcaac 900
ctccttccag acacccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
ttgaatagtg ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
tgcaaggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atctag 1116

<210> 6

<211> 1092

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atggcccccg gcgaggcgct gctggcgggt ctccctggta tggtaactggc cgtggcgctg 60
ctatccaacg cactggtgct gctttgtgc gcctacagcg ctgagctccg cactcgagcc 120
tcaggcgtcc tcctggtaa tctgtcttg ggccacctgc tgctggcggc gctggacatg 180
cccttcacgc tgctcggtgt gatgcgcggg cggacaccgt cggcgccgg cgcatgccaa 240
gtcattggct tcctggacac cttccctggcg tccaacgcgg cgctgagcgt ggcggcgctg 300
agcgcagacc agtggctggc agtgggcttc ccactgcgt acgcggacg cctgcgaccg 360
cgctatgcgg gcctgctgct gggctgtgcc tggggacagt cgctggcctt ctcaggcgct 420
gcacttggct gctcgtggct tggctacagc agegccttcg cgtccctgttc gctgcgcctg 480
ccgccccgagc ctgagcgtcc gcgcgttgcgc gccttcacccg ccacgcgtcca tgccgtggc 540

16 / 66

ttcgtgctgc cgctggcggt gctctgcctc acctcgctcc aggtgcacccg ggtggcacgc 600
agacactgcc agcgcatgga caccgtcacc atgaaggcgc tcgcgcgtct cggccacactg 660
caccggcgt tgccggcagcg ctgcctcatac cagcagaagc ggccggccca ccggccacc 720
aggaagattt gcattgctat tggcacccttc ctcatctgtt ttgccccgtta tgtcatgacc 780
aggctggcgg agctcggtcc ctgcgtcacc gtgaacgccc agtggggcat cctcagcaag 840
tgccctgacct acagcaaggc ggtggccgac ccgttcacgt actctctgtt ccggccggccg 900
ttccggccaag tcctggccgg catggtcac cggctgtga agagaacccc gggcccaagca 960
tccacccatg acagctctt ggtatgtggcc ggcattggtc accagctgtt gaagagaacc 1020
ccggcccaag cgtccaccca caacggctt gtggacacag agaatgattt ctgcctgcag 1080
cagacacactt ga 1092

<210> 7

<211> 1260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgctggcag ctgccttgc agactctaac tccagcagca tgaatgtgtc ctttgcac 60
ctccacttttgc cggagggtt cctggccctt gattccagg actggagaac catcatcccg 120
gctctttgg tggctgtctg cctgggtggc ttctgtggaa acctgtgtgt gattggcattc 180
ctccttcaca atgcttggaa aggaaagcca tccatgatecc actccctgtat tctgaatctc 240
aggctggctg atctctccct cctgctgttt tctgcaccta tccgagctac ggcgtactcc 300
aaaagtgttt gggatctagg ctgggttgtc tgcaagtctt ctgactggtt tatccacaca 360
tgcatggcag ccaagagcct gacaatcggtt gtggtggccaa aagtatgctt catgtatgca 420
agtgacccag ccaagcaagt gagtatccac aactacacca tctggtcagt gctggtggcc 480

17 / 66

atctggactg tggcttagcct gttaccctg ccggaatggt tcttttagcac catcaggcat 540
catgaaggtg tggaaatgtg cctcggtggat gtaccagctg tggctgaaga gtttatgtcg 600
atgtttggta agctctaccc actcctggca ttggccttc cattatttt tgccagctt 660
tatttctgga gagcttatga ccaatgtaaa aaacgaggaa ctaagactca aaatctttaga 720
aaccagatac gctcaaagca agtcacagtg atgctgctga gcattgccat catctctgct 780
gtcttggtgc tccccgaatg ggtagcttgg ctgtgggtat ggcacatgtaa ggctgcaggc 840
ccggccccac cacaagggtt catagccctg tctcaagtct tgatgtttc catctttca 900
gcaaatcctc tcattttct tgtatgtcg gaagagttca gggaggcatt gaaagggtgt 960
tgaaaatgga tgataaccaa aaaacctcca actgtctcag agtctcagga aacaccagct 1020
ggcaactcag agggtcttcc tgacaagggtt ccatctccag aatccccagc atccatacca 1080
aaaaaaagaga aacccagetc tccctcttgc gcaaaggaa aaactgagaa ggcagagatt 1140
cccatccttc ctgacgtaga gcagtttgg catgagaggg acacagtccc ttctgtacag 1200
gacaatgacc ctatccctg ggaacatgaa gatcaagaga cagggaaagg tggtaaatag 1260

<210> 8

<211> 1182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggagacca ccatgggtt catggatgac aatgccacca acacttccac cagttcctt 60
tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120
gactatgata tgccttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttcttgct 180
gccaagatttgc tcattggat ggccttggtg ggcacatcatgc tggctgcgg cattggaaac 240
ttcatcttta tcgctgcctt ggtccgcac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300

18 / 66

atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgtgccc cttttagatg 360
gactactatg tggtgccca gctctctgg gaggcacggcc acgttcgtg cacctctgtc 420
aactacactgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catgccatt 480
gacaggtatc tggctattgt ccatcccgctg agaccacgga tgaagtgcca aacagccact 540
ggcctgatttgc cttgggtgtg gacgggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgccctacttc 600
accaccgaga cggtcctcgat cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcctacttcc tcttatctt tggcatagaa 720
ttcgtgggcc ccgtggtcac catgaccctg tgctatgcca ggatctcccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840
aagacggtcc tggtgctcat gtgcatttc accgcctacg tgctatgctg ggccccccttc 900
tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcaactgcct tctacatcgat cgagtgcattc gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080
tggaggcattt cttacaatgg cggtaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcattc agactaaaaat aa 1182

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

1 9 / 6 6

<400> 9

atgccagcca acttcacaga gggcagct

28

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

ctagatgaat tctggcttgg acagaatc

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

20 / 66

<400> 11

atgggccccg gcgaggcgct gctggcgg

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

tcagtgtgtc tgctgcaggc aggaatca

28

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

2 1 / 6 6

<400> 13

atgctggcag ctgccttgc agactctaac 30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

ctatttaaca cttcccttg tctcttgatc 30

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

22 / 66

<400> 15

atggagacca ccatgggtt catggatg 28

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

ttattttagt ctgatgcagt ccacctttc 30

<210> 17

<211> 434

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Glu Asp Leu Phe Ser Pro Ser Ile Leu Pro Pro Ala Pro Asn Ile

1

5

10

15

23 / 66

Ser Val Pro Ile Leu Leu Gly Trp Gly Leu Asn Leu Thr Leu Gly Gln

20

25

30

Gly Ala Pro Ala Ser Gly Pro Pro Ser Arg Arg Val Arg Leu Val Phe

35

40

45

Leu Gly Val Ile Leu Val Val Ala Val Ala Gly Asn Thr Thr Val Leu

50

55

60

Cys Arg Leu Cys Gly Gly Gly Pro Trp Ala Gly Pro Lys Arg Arg

65

70

75

80

Lys Met Asp Phe Leu Leu Val Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Tyr Ala

85

90

95

Cys Gly Gly Thr Ala Leu Ser Gln Leu Ala Trp Glu Leu Leu Gly Glu

100

105

110

Pro Arg Ala Ala Thr Gly Asp Leu Ala Cys Arg Phe Leu Gln Leu Leu

115

120

125

Gln Ala Ser Gly Arg Gly Ala Ser Ala His Leu Val Val Leu Ile Ala

130

135

140

Leu Glu Arg Arg Arg Ala Val Arg Leu Pro His Gly Arg Pro Leu Pro

145

150

155

160

2 4 / 6 6

Ala Arg Ala Leu Ala Ala Leu Gly Trp Leu Leu Ala Leu Leu Ala

165 170 175

Leu Pro Pro Ala Phe Val Val Arg Gly Asp Ser Pro Ser Pro Leu Pro

180 185 190

Pro Pro Pro Pro Pro Thr Ser Leu Gln Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala

195 200 205

Arg Ala Trp Pro Gly Gln Arg Arg Cys His Gly Ile Phe Ala Pro Leu

210 215 220

Pro Arg Trp His Leu Gln Val Tyr Ala Phe Tyr Glu Ala Val Ala Gly

225 230 235 240

Phe Val Ala Pro Val Thr Val Leu Gly Val Ala Cys Gly His Leu Leu

245 250 255

Ser Val Trp Trp Arg His Arg Pro Gln Ala Pro Ala Ala Ala Pro

260 265 270

Trp Ser Ala Ser Pro Gly Arg Ala Pro Ala Pro Ser Ala Leu Pro Arg

275 280 285

Ala Lys Val Gln Ser Leu Lys Met Ser Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe

25 / 66

290 295 300

Val Gly Cys Glu Leu Pro Tyr Phe Ala Ala Arg Leu Ala Ala Ala Trp

305 310 315 320

Ser Ser Gly Pro Ala Gly Asp Trp Glu Gly Glu Gly Leu Ser Ala Ala

325 330 335

Leu Arg Val Val Ala Met Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Phe Val Tyr

340 345 350

Leu Phe Phe Gln Ala Gly Asp Cys Arg Leu Arg Arg Gln Leu Arg Lys

355 360 365

Arg Leu Gly Ser Leu Cys Cys Ala Pro Gln Gly Gly Ala Glu Asp Glu

370 375 380

Glu Gly Pro Arg Gly His Gln Ala Leu Tyr Arg Gln Arg Trp Pro His

385 390 395 400

Pro His Tyr His His Ala Arg Arg Glu Pro Leu Asp Glu Gly Leu

405 410 415

Arg Pro Pro Pro Pro Arg Pro Arg Pro Leu Pro Cys Ser Cys Glu Ser

420 425 430

2 6 / 6 6

Ala Phe

<210> 18

<211> 451

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Glu Ser Ser Pro Ile Pro Gln Ser Ser Gly Asn Ser Ser Thr Leu

1

5

10

15

Gly Arg Val Pro Gln Thr Pro Gly Pro Ser Thr Ala Ser Gly Val Pro

20

25

30

Glu Val Gly Leu Arg Asp Val Ala Ser Glu Ser Val Ala Leu Phe Phe

35

40

45

Met Leu Leu Leu Asp Leu Thr Ala Val Ala Gly Asn Ala Ala Val Met

50

55

60

Ala Val Ile Ala Lys Thr Pro Ala Leu Arg Lys Phe Val Phe Val Phe

65

70

75

80

His Leu Cys Leu Val Asp Leu Leu Ala Ala Leu Thr Leu Met Pro Leu

27 / 66

85 90 95

Ala Met Leu Ser Ser Ser Ala Leu Phe Asp His Ala Leu Phe Gly Glu

100 105 110

Val Ala Cys Arg Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Val Cys Phe Val Ser Leu

115 120 125

Ala Ile Leu Ser Val Ser Ala Ile Asn Val Glu Arg Tyr Tyr Tyr Val

130 135 140

Val His Pro Met Arg Tyr Glu Val Arg Met Thr Leu Gly Leu Val Ala

145 150 155 160

Ser Val Leu Val Gly Val Trp Val Lys Ala Leu Ala Met Ala Ser Val

165 170 175

Pro Val Leu Gly Arg Val Ser Trp Glu Glu Gly Ala Pro Ser Val Pro

180 185 190

Pro Gly Cys Ser Leu Gln Trp Ser His Ser Ala Tyr Cys Gln Leu Phe

195 200 205

Val Val Val Phe Ala Val Leu Tyr Phe Leu Leu Pro Leu Leu Ile

210 215 220

28 / 66

Leu Val Val Tyr Cys Ser Met Phe Arg Val Ala Arg Val Ala Ala Met

225 230 235 240

Gln His Gly Pro Leu Pro Thr Trp Met Glu Thr Pro Arg Gln Arg Ser

245 250 255

Glu Ser Leu Ser Ser Arg Ser Thr Met Val Thr Ser Ser Gly Ala Pro

260 265 270

Gln Thr Thr Pro His Arg Thr Phe Gly Gly Gly Lys Ala Ala Val Val

275 280 285

Leu Leu Ala Val Gly Gly Gln Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Phe

290 295 300

Ser Phe His Leu Tyr Val Ala Leu Ser Ala Gln Pro Ile Ser Thr Gly

305 310 315 320

Gln Val Glu Ser Val Val Thr Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Phe Thr Ser

325 330 335

Asn Pro Phe Phe Tyr Gly Cys Leu Asn Arg Gln Ile Arg Gly Glu Leu

340 345 350

Ser Lys Gln Phe Val Cys Phe Phe Lys Pro Ala Pro Glu Glu Glu Leu

355 360 365

2 9 / 6 6

Arg Leu Pro Ser Arg Glu Gly Ser Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gln Phe

370

375

380

Leu Gln Gly Thr Gly Cys Pro Ser Glu Ser Trp Val Ser Arg Pro Leu

385

390

395

400

Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Pro Ala Val Asp Phe Arg Ile Pro Gly

405

410

415

Gln Ile Ala Glu Glu Thr Ser Glu Phe Leu Glu Gln Gln Leu Thr Ser

420

425

430

Asp Ile Ile Met Ser Asp Ser Tyr Leu Arg Pro Ala Ala Ser Pro Arg

435

440

445

Leu Glu Ser

450

<210> 19

<211> 321

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

30 / 66

Met Asn Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Thr Val Glu Ser Ala Leu Asn

1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Ser Thr Val His Thr Ala Tyr Leu Val Leu Ser Ser

20 25 30

Leu Ala Met Phe Thr Cys Leu Cys Gly Met Ala Gly Asn Ser Met Val

35 40 45

Ile Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met His Arg Asn Pro Phe Cys Ile Tyr

50 55 60

Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Phe Leu Phe Ser Met Ala

65 70 75 80

Ser Thr Leu Ser Leu Glu Thr Gln Pro Leu Val Asn Thr Thr Asp Lys

85 90 95

Val His Glu Leu Met Lys Arg Leu Met Tyr Phe Ala Tyr Thr Val Gly

100 105 110

Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser Val Leu

115 120 125

Phe Pro Ile Trp Phe Lys Cys His Arg Pro Arg His Leu Ser Ala Trp

130 135 140

3 1 / 6 6

Val Cys Gly Leu Leu Trp Thr Leu Cys Leu Leu Met Asn Gly Leu Thr
145 150 155 160

Ser Ser Phe Cys Ser Lys Phe Leu Lys Phe Asn Glu Asp Arg Cys Phe
165 170 175

Arg Val Asp Met Val Gln Ala Ala Leu Ile Met Gly Val Leu Thr Pro
180 185 190

Val Met Thr Leu Ser Ser Leu Thr Leu Phe Val Trp Val Arg Arg Ser
195 200 205

Ser Gln Gln Trp Arg Arg Gln Pro Thr Arg Leu Phe Val Val Val Leu
210 215 220

Ala Ser Val Leu Val Phe Leu Ile Cys Ser Leu Pro Leu Ser Ile Tyr
225 230 235 240

Trp Phe Val Leu Tyr Trp Leu Ser Leu Pro Pro Glu Met Gln Val Leu
245 250 255

Cys Phe Ser Leu Ser Arg Leu Ser Ser Ser Val Ser Ser Ala Asn
260 265 270

Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Arg Arg Ser His Arg Leu Pro

32 / 66

275 280 285

Thr Arg Ser Leu Gly Thr Val Leu Gln Gln Ala Leu Arg Glu Glu Pro

290 295 300

Glu Leu Glu Gly Gly Glu Thr Pro Thr Val Gly Thr Asn Glu Met Gly

305 310 315 320

Ala

<210> 20

<211> 333

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Lys Val Asp Met Asn Thr Ser Gln Glu Gln Gly Leu Cys Gln

1 5 10 15

Phe Ser Glu Lys Tyr Lys Gln Val Tyr Leu Ser Leu Ala Tyr Ser Ile

20 25 30

Ile Phe Ile Leu Gly Leu Pro Leu Asn Gly Thr Val Leu Trp His Phe

35 40 45

33 / 66

Trp Gly Gln Thr Lys Arg Trp Ser Cys Ala Thr Thr Tyr Leu Val Asn

50 55 60

Leu Met Val Ala Asp Leu Leu Tyr Val Leu Leu Pro Phe Leu Ile Ile

65 70 75 80

Thr Tyr Ser Leu Asp Asp Arg Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys

85 90 95

Leu Val His Phe Leu Phe Tyr Ile Asn Leu Tyr Gly Ser Ile Leu Leu

100 105 110

Leu Thr Cys Ile Ser Val His Gln Phe Leu Gly Val Cys His Pro Leu

115 120 125

Cys Ser Leu Pro Tyr Arg Thr Arg Arg His Ala Trp Leu Gly Thr Ser

130 135 140

Thr Thr Trp Ala Leu Val Val Leu Gln Leu Leu Pro Thr Leu Ala Phe

145 150 155 160

Ser His Thr Asp Tyr Ile Asn Gly Gln Met Ile Trp Tyr Asp Met Thr

165 170 175

Ser Gln Glu Asn Phe Asp Arg Leu Phe Ala Tyr Gly Ile Val Leu Thr

34 / 66

180 185 190

Leu Ser Gly Phe Leu Ser Leu Leu Gly His Phe Gly Val Leu Phe Thr

195 200 205

Asp Gly Gln Glu Pro Asp Gln Ala Arg Gly Glu Pro His Glu Asp Arg

210 215 220

Gln His Ser Pro Ser Gln Val His Pro Asp His Pro Thr Gly Val Trp

225 230 235 240

Pro Leu His Pro Leu Phe Cys Ala Leu Pro Tyr His Ser Leu Leu Leu

245 250 255

Pro His His Leu Leu Ser Ala Phe Ser Gly Leu Pro Ala Leu Asp Gly

260 265 270

Ser Gln Cys Gly Leu Gln Asp Met Glu Ala Ser Gly Glu Cys Glu Gln

275 280 285

Leu Pro Gln Pro Ser Pro Val Leu Ser Phe Lys Gly Gly Lys Asn Arg

290 295 300

Val Arg Leu Leu Gln Lys Leu Arg Gln Asn Lys Leu Gly Glu His Pro

305 310 315 320

35 / 66

Ala Gly Arg Lys Arg Cys Pro Gly Leu Asn Arg Ser Gly

325

330

<210> 21

<211> 508

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Thr Ser Thr Cys Thr Asn Ser Thr Arg Glu Ser Asn Ser Ser His

1

5

10

15

Thr Cys Met Pro Leu Ser Lys Met Pro Ile Ser Leu Ala His Gly Ile

20

25

30

Ile Arg Ser Thr Val Leu Val Ile Phe Leu Ala Ala Ser Phe Val Gly

35

40

45

Asn Ile Val Leu Ala Leu Val Leu Gln Arg Lys Pro Gln Leu Leu Gln

50

55

60

Val Thr Asn Arg Phe Ile Phe Asn Leu Leu Val Thr Asp Leu Leu Gln

65

70

75

80

Ile Ser Leu Val Ala Pro Trp Val Val Ala Thr Ser Val Pro Leu Phe

36 / 66

85 90 95

Trp Pro Leu Asn Ser His Phe Cys Thr Ala Leu Val Ser Leu Thr His

100 105 110

Leu Phe Ala Phe Ala Ser Val Asn Thr Ile Val Val Val Ser Val Asp

115 120 125

Arg Tyr Leu Ser Ile Ile His Pro Leu Ser Tyr Pro Ser Lys Met Thr

130 135 140

Gln Arg Arg Gly Tyr Leu Leu Leu Tyr Gly Thr Trp Ile Val Ala Ile

145 150 155 160

Leu Gln Ser Thr Pro Pro Leu Tyr Gly Trp Gly Gln Ala Ala Phe Asp

165 170 175

Glu Arg Asn Ala Leu Cys Ser Met Ile Trp Gly Ala Ser Pro Ser Tyr

180 185 190

Thr Ile Leu Ser Val Val Ser Phe Ile Val Ile Pro Leu Ile Val Met

195 200 205

Ile Ala Cys Tyr Ser Val Val Phe Cys Ala Ala Arg Arg Gln His Ala

210 215 220

37 / 66

Leu Leu Tyr Asn Val Lys Arg His Ser Leu Glu Val Arg Val Lys Asp

225

230

235

240

Cys Val Glu Asn Glu Asp Glu Glu Gly Ala Glu Lys Lys Glu Glu Phe

245

250

255

Gln Asp Glu Ser Glu Phe Arg Arg Gln His Glu Gly Glu Val Lys Ala

260

265

270

Lys Glu Gly Arg Met Glu Ala Lys Asp Gly Ser Leu Lys Ala Lys Glu

275

280

285

Gly Ser Thr Gly Thr Ser Glu Ser Ser Val Glu Ala Arg Gly Ser Glu

290

295

300

Glu Val Arg Glu Ser Ser Thr Val Ala Ser Asp Gly Ser Met Glu Gly

305

310

315

320

Lys Glu Gly Ser Thr Lys Val Glu Glu Asn Ser Met Lys Ala Asp Lys

325

330

335

Gly Arg Thr Glu Val Asn Gln Cys Ser Ile Asp Leu Gly Glu Asp Asp

340

345

350

Met Glu Phe Gly Glu Asp Asp Ile Asn Phe Ser Glu Asp Asp Val Glu

355

360

365

38 / 66

Ala Val Asn Ile Pro Glu Ser Leu Pro Pro Ser Arg Arg Asn Ser Asn

370 375 380

Ser Asn Pro Pro Leu Pro Arg Cys Tyr Gln Cys Lys Ala Ala Lys Val

385 390 395 400

Ile Phe Ile Ile Ile Phe Ser Tyr Val Leu Ser Leu Gly Pro Tyr Cys

405 410 415

Phe Leu Ala Val Leu Ala Val Trp Val Asp Val Glu Thr Gln Val Pro

420 425 430

Gln Trp Val Ile Thr Ile Ile Trp Leu Phe Phe Leu Gln Cys Cys

435 440 445

Ile His Pro Tyr Val Tyr Gly Tyr Met His Lys Thr Ile Lys Lys Glu

450 455 460

Ile Gln Asp Met Leu Lys Lys Phe Phe Cys Lys Glu Lys Pro Pro Lys

465 470 475 480

Glu Asp Ser His Pro Asp Leu Pro Gly Thr Glu Gly Gly Thr Glu Gly

485 490 495

Lys Ile Val Pro Ser Tyr Asp Ser Ala Thr Phe Pro

3 9 / 6 6

500

505

<210> 22

<211> 1305

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

atggaggatc tcttagccc ctaattctg ccgcggcgc ccaacatttc cgtccccatc 60
ttgctggct ggggtctcaa cctgacccctt gggcaaggag cccctgcctc tggccgccc 120
agccgcccgcg tccgcctgggt gttcctgggg gtcatccctgg tggggcggt ggcaggcaac 180
accacagtgc tgtgccgcct gtgcggcggc ggcggccct gggcggccccc caagcgtcgc 240
aagatggact tcctgctgggt gcagctggcc ctggcggacc tgtacgcgtg cggggcacg 300
gcgcgtgtcac agctggcctg ggaactgctg ggcgagcccc ggcggccac gggggacctg 360
gcgtgccgct tcctgcagct gctgcaggca tccggcgggg ggcgcctcgcc ccacctcg 420
gtgctcatcg ccctcgagcg cggcgccgcg gtgcgtcttc cgacggccg ggcgtgccc 480
gcgcgtgccc tcgcgcgcct gggctggctg ctggcactgc tgctggcgct gccccggcc 540
ttcgtggtgc gggggactc cccctcgccg ctggcgcgcg cggccgcgc aacgtccctg 600
cagccaggcg cgccccggc cgcccgccgc tggccggggc agcgtcgctg ccacgggatc 660
ttcgcgcgcc tcgcgcgtg gcacctgcag gtctacgcgt tctacgaggc cgtcgccggc 720
ttcgtcgccgc ctgttacggc cttggcgctc gcttgcggcc acctacttc cgtctgggtgg 780
cggcaccggc cgcaaggcccc cgccgctgca ggcgcctggc cggcgagcccc aggtcgagcc 840
cctgcgcaca gcgcgcgtcc cgcgcacaag gtgcagagcc tgaagatgag cctgctgctg 900
gegctgctgt tcgtggcgtc cgagctgccc tactttgcgg cccggctggc ggccgcgtgg 960
tcgtccgggc cgcgggaga ctgggaggga gagggcctgt cggcgccgt gcgcgtgg 1020

40 / 66

gcgatggcca acagcgctc caatccctc gtctacccct tcttccaggc gggcgactgc 1080
cggtccggc gacagctgcg gaagcggctg ggctctctgt gctgcggccc gcagggaggc 1140
geggaggacg aggaggggcc cggggccac caggcgctc accgccaacg ctggccccac 1200
cctcattatc accatgctcg gccccaccg ctggacgagg gccgcttgcg cccacccct 1260
ccgcgccccca gaccctgcc ttgctctgc gaaagtgcct tctag 1305

<210> 23

<211> 1356

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atggagtcct cacccatccc ccagtcatca gggaaactttt ccactttggg gagggtccct 60
caaaccggcag gtccctctac tgccagtggtt gtcccgagg tggggctacg ggatgttgc 120
tcggaatctg tggccctttt cttcatgctc ctgctggact tgactgtgt ggctggcaat 180
ggcgctgtga tggccgtat cgccaaagacg cctggccctcc gaaaatttgtt cttcgcttcc 240
cacctctgcc tggtgacact gctggctgcc ctgaccctca tgccctggc catgctctcc 300
agctctgccc tctttgacca cgccctctttt ggggaggtgg cctggccctt ctacttggttt 360
ctgagcgtgt gctttgtcag cctggccatc ctctcggtgt cagccatcaa tgtggagcgc 420
tactattacg tagtccaccc catgcgtac gaggtgcgcgca tgacgctggg gctgggtggcc 480
tctgtgtgg tgggtgtgt ggtgaaggcc ttggccatgg cttctgtgcc agtgttggga 540
agggtctccct gggaggaagg agctcccaagt gtcccccag gctgttcaact ccagtgaggc 600
cacagtgcct actgccagct ttttgggt gtctttgtc tcctttactt tctgttggcc 660
ctgctctca tacttgtgtt ctactgcagc atgttccgag tggcccggtt ggctgccatg 720
cagcacgggc cgctgcccac gtggatggag acacccggc aacgctccga atctctcagc 780

41 / 66

agccgctcca cgatggcac cagctcgaaa gccccccaga ccacccaca ccggacgtt 840
gggggaggga aagcagcagt ggttctcctg gctgtgggg gacagttcct gctctgttg 900
ttgcctact tctttccca cctctatgtt gccctgagtg cttagcccat ttcaactggg 960
caggtggaga gtgtggcac ctggattggc tactttgtt tcacttccaa cccttcttc 1020
tatggatgtc tcaaccggca gatccggggg gagctcagca agcagtttgt ctgcttcttc 1080
aagccagctc cagaggagga gctgaggctg cctagccggg agggctccat tgaggagaac 1140
ttcctgcagt tccttcaggg gactggctgt cttctgagt cctgggtttc ccgacccta 1200
cccagccccca agcaggagcc acctgctgtt gactttcgaa tcccaggcca gatacgctgag 1260
gagacctctg agttctgga gcagcaactc accagcgaca tcatcatgtc agacagctac 1320
ctccgtctg ccgcctcacc ccggctggag tcatga 1356

<210> 24

<211> 966

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

atgaaccaga ctttgaatag cagtggacc gtggagtca gcttaaacta ttccagaggg 60
agcacagtgc acacggccta cctgggtctg agctccctgg ccatgttca ctcgcctgtgc 120
ggatggcag gcaacagcat ggtgatctgg ctgctggct ttcgaatgca caggaacccc 180
ttctgcatct atatcctcaa cctggcggca gccgacccctc tttccctttt cagcatggct 240
tccacgctca gcctggaaac ccagccctg gtcaatacca ctgacaagggt ccacgagctg 300
atgaagagac tggatgtactt tgcctacaca gtgggcctga gcctgctgac ggccatcagc 360
acccagcgct gtctctctgt cctttccct atctggttca agtgtcacccg gcccaggcac 420
ctgtcagcct ggggtgtgtgg cctgctgtgg acactctgtc tccgtatgaa cgggttgacc 480

42 / 66

tcttccttct gcagcaagtt ctggaaattc aatgaagatc ggtgcttcag ggtggacatg 540
gtccaggccg ccctcatcat ggggtctta accccagtga tgactctgtc cagcctgacc 600
ctcttigtct gggtgcggag gagctcccag cagtggccgc ggcagcccac acggctgttc 660
gtggtggtcc tggcctctgt cctggtgttc ctcatctgtt ccctgcctct gagcatctac 720
tggtttgc tctactggtt gagcctgccc cccgagatgc aggtcctgtg cttagcttg 780
tcacgcctct cctcgccgt aagcagcagc gccaaccccg tcatctactt cctggtgccc 840
agccggagga gccacaggct gcccaccagg tccctggga ctgtgcctca acaggcgctt 900
cgcgaggagc ccgagctgga aggtggggag acgcccaccg tggcaccaa ttagatgggg 960
gcttga 966

<210> 25

<211> 1002

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

atggagaagg tggacatgaa tacatcacag gaacaaggtc tctgccagtt ctcagagaag 60
tacaagcaag tctacctctc cctggcctac agtatcatct ttatcctagg gctgccacta 120
aatggcactg tcttggca cttctgggc caaacaagc gctggagctg tgccaccacc 180
tatctggtga acctgatggt ggccgacctg ctttatgtgc tattgccctt cctcatcatc 240
acctactcac tagatgacag gtggcccttc ggggagctgc tctgaagct ggtgcacttc 300
ctgttctata tcaaccttta cggcagcata ctgctgctga cctgcatactc tgtgcaccag 360
ttccttaggtg tgtgccaccc actgtgttcg ctgcctacc ggacccgcag gcatgcctgg 420
ctggcacca gcaccacctg ggccctggtg gtcctccagc tgctgcccac actggcccttc 480
tcccacacgg actacatcaa tggccagatg atctggatg acatgaccag ccaagagaat 540

4 3 / 6 6

tttgcgtggc tttttgccta cggcatagtt ctgacattgt ctggctttct ttcccttcctt 600
ggtcattttg gtgtgctatt cactgatggt caggagccctg atcaagccag aggagaacct 660
catgaggaca ggcaacacag cccgagccag gtccatccgg accatcctac tggtgtgtgg 720
cctcttcacc ctctgttttg tgcccttcca tatcactcgc tccttctacc tcaccatctg 780
ctttctgtttt tctcaggact gccagctctt gatggcagcc agtgtggcct acaagatatg 840
gaggcctctg gtgagtgtga gcagctgcct caacccagtc ctgtacttcc tttcaagggg 900
ggcaaaaata gagtcaggct cctccagaaaa ctgaggcaga acaagttggg tgagcatcca 960
gctgggagga agagatgccc agggttgaac agatctgggt aa 1002

<210> 26

<211> 1527

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atgacgtcca cctgcaccaa cagcacgcgc gagagtaaca gcagccacac gtgcattgccc 60
ctctccaaaa tgcccatcag cctggccac ggcattatcc gctcaaccgt gctggttatc 120
ttcctcgccg cctcttcgt cggcaacata gtgcggcgc tagtggca ggcgaagccg 180
cagctgctgc aggtgaccaa ccgtttatc tttaacctcc tcgtcaccga cctgctgcag 240
attcgctcg tggccccctg ggtggtgcc acctctgtgc ctctttctg gcccctcaac 300
agccacttct gcacggccct ggttagcctc acccacctgt tcgccttcgc cagcgtcaac 360
accattgtct tgggtcagt ggatcgctac ttgtccatca tccaccctct ctcttacccg 420
tccaagatga cccagcgccg cggttacctg ctccctatg gcacctggat tgtggccatc 480
ctgcagagca ctccctccact ctacggctgg ggccaggctg cctttgatga ggcgaatgct 540
ctctgctcca tggatctgggg ggccagcccc agctacacta ttctcagcgt ggtgtccttc 600

44 / 66

atcgtcattc cactgattgt catgattgcc tgctactccg tggtgttctg tgcagccccgg 660
aggcagcatg ctctgctgta caatgtcaag agacacagct tggaagtgcg agtcaaggac 720
tgtgtggaga atgaggatga agagggagca gagaagaagg aggagttcca ggatgagagt 780
gagtttcgcc gccagcatga aggtgaggtc aaggccaagg agggcagaat ggaagccaag 840
gacggcagcc tgaaggccaa ggaaggaagc acggggacca gtgagagtag tgtagaggcc 900
aggggcagcg aggaggtcag agagagcagc acggtgccca gcgcacggcag catggaggt 960
aaggaaggca gcaccaaagt tgaggagaac agcatgaagg cagacaaggg tcgcacagag 1020
gtcaaccagt gcagcattga ctgggtgaa gatgacatgg agtttgta agacgacatc 1080
aatttcagt aggatgacgt cgaggcagtg aacatcccg agagectccc acccagtctg 1140
cgtaacagca acagcaaccc tcctctgccc aggtgctacc agtgc当地 agtgc当地 1200
atcttcataca tcatttcctc ctatgtgcta tccctgggc cctactgctt tttagcagtc 1260
ctggccgtgt gggtggatgt cgaacccag gtacccagt gggtgatcac cataatcatc 1320
tggctttct tcctgcagtg ctgcattcac ccctatgtct atggctacat gcacaagacc 1380
attaagaagg aaatccagga catgctgaag aagttcttct gcaaggaaaa gcccccgaaa 1440
gaagatagcc acccagacct gccggaaaca gagggtgaaa ctgaaggcaa gattgtccct 1500
tcctacgatt ctgctacttt tccttga 1527

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

4 5 / 6 6

<400> 27

atggaggatc tcttagccc ctcaattc

28

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 28

ctagaaggca ctttcgcagg agcaaggc

28

<210> 29

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

4 6 / 6 6

<400> 29

atggagtcc tacccatccc ccagtcata

29

<210> 30

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 30

tcatgactcc agccgggtg aggccgcag

29

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

4 7 / 6 6

<400> 31

atgaaccaga ctttgaatag cagtgg

26

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 32

tcaaggcccc atctcattgg tgcccacg

28

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

4 8 / 6 6

<400> 33

atggagaagg tggacatgaa tacatcac

28

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 34

ttacccagat ctgttcaacc ctgggcattc

29

<210> 35

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

4 9 / 6 6

<400> 35

atgacgtcca cctgcaccaa cagcacgc

28

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 36

tcaaggaaaa gtagcagaat cgttaggaag

29

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

50 / 66

<400> 37

ccaggaggcgt ttctatgcct

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 38

tgtgatcttt gtcgcctgca

20

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized TaqMan probe sequence

5 1 / 6 6

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (28)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 39

tcagaacctg ccagcattga atagtgcc

28

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 40

5 2 / 6 6

atctgcttg ccccgatgt

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 41

accgccttgc tgttagtcag

20

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

5 3 / 6 6

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (22)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 42

tcgtgccctt cgtcaccgtg aa

22

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 43

cccagcatcc ataccagaaa a

21

5 4 / 6 6

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 44

ctgtgtccct ctcatgccaa a

21

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

5 5 / 6 6

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (28)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 45

tgagaaggca gagattccca tccttcct

28

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 46

tcgccatgag caacagcat

19

<210> 47

5 6 / 6 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 47

cactggactt accgccattg t

21

<210> 48

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

5 7 / 6 6

<220>

<221> misc_binding

<222> (29)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 48

agatcatgtt gctccactgg aaggcttct

29

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 49

ggatctcttt agcccctcaa ttc

23

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

5 8 / 6 6

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 50

aaggtaagg tgagacccca g

21

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

5 9 / 6 6

<222> (25)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 51

aacatttccg tgcccatctt gctgg

25

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 52

gctgttgact ttcgaatccc a

21

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

6 0 / 6 6

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 53

acggaggtag ctgtctgaca tga

23

<210> 54

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

6 1 / 6 6

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 54

tgagttcctg gagcagcaac tcacca

26

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 55

ggctttcgaa tgcacaggaa

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

6 2 / 6 6

synthesized primer sequence

<400> 56

ggaagccatg ctgaagagga

20

<210> 57

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (28)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

63 / 66

<400> 57

ttctgcatct atatcctcaa cctggcg

28

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 58

tggcctcttc accctctgtt t

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

6 4 / 6 6

<400> 59

atcaagagct ggcagtccctg a

21

<210> 60

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (30)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 60

tccatatcac tcgctccctt tacacctacca

30

65 / 66

<210> 61

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 61

ccaaaatgcc catcagcct

19

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 62

gcactatgtt gccgacgaaa

20

6 6 / 6 6

<210> 63

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 63

catccgctca accgtgctgg ttatct

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705,
 C07K15/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K31/711, A61K48/00, A61P43/00,
 G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/09, C07K14/705

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP, 8-245697, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 24 September, 1996 (24.09.96) (Family: none) | 1-15, 17 |
| A | WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARM INC), 22 January, 1998 (22.01.98) & AU, 9869736, A & US, 5891720, A & EP, 1007536, A1 | 1-15, 17 |
| A | WO, 99/37679, A1 (MILLENNIUM PHARM INC), 29 July, 1999 (29.07.99) & US, 5945307, A & AU, 9922369, A & EP, 1056777, A1 | 1-15, 17 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | | | |
|-----|---|-----|--|
| "A" | Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "B" | earlier document but published on or after the international filing date | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 27 March, 2001 (27.03.01) | Date of mailing of the international search report 10 April, 2001 (10.04.01) |
|--|---|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
|--|--------------------|

| | |
|---------------|---------------|
| Facsimile No. | Telephone No. |
|---------------|---------------|

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09408

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 16 pertains to methods for diagnosis of diseases and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 15 and 17 are divided into groups of 9 individual inventions, i.e., inventions relating to DNAs encoding the amino acids of SEQ ID NOS:1 to 4 and 17 to 21, and DNAs having the sequences of SEQ ID NOS:5 to 8 and 22 to 26. These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 to 15 and 17 (inventions relating to the DNA encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and the DNA having the sequence of SEQ ID NO:5)

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/09408

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10,
 C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K
 31/711, A61K48/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C12N15/00~15/09, C07K14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | J P, 8-245697, A (武田薬品工業株式会社) 24. 9 月. 1996 (24. 09. 96) (ファミリーなし) | 1-15, 1 7 |
| A | WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 22. 1 月. 1998 (22. 01. 98) &AU, 9869736, A& US, 5891720, A&EP, 1007536, A1 | 1-15, 1 7 |
| A | WO, 99/37679, A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 29. 7 月. 1999 (29. 07. 99) &US, 5945307, A& AU, 9922369, A&EP, 1056777, A1 | 1-15, 1 7 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

| | |
|---|---|
| 国際調査を完了した日 27. 03. 01 | 国際調査報告の発送日 1 04.01 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 印 4 N 8114 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 16 の発明は、疾病の診断方法に該当し、特許協力条約第17条(2)(a)(i) 及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-15, 17 に記載された発明は、配列番号 1-4, 17-21 のアミノ酸配列をコードするDNA、または配列番号 5-8, 22-26 の配列を有するDNAに係る発明群という、個々の9の発明に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは、認められない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-15, 17 (配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするDNA、及び配列番号 5 の配列を有するDNAに係る部分の発明)

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。